

# ANNALES

## DE

# L'INSTITUT PASTEUR

### ÉTUDE SUR LE COMPORTEMENT DU TRÉPONÈME DE REITER EN MILIEU PÉNICILLINÉ

par P. GASTINEL, P. COLLART et F. DUNOYER (\*).

(Institut Alfred-Fournier et Institut National d'Hygiène)

Les syphiligraphes s'inquiètent de savoir si les traitements à la pénicilline sont susceptibles d'agir sur le tréponème pâle en créant des races résistantes *in vivo* ; ainsi seraient interprétées différentes constatations cliniques ou sérologiques.

Certes, des travaux innombrables ont précisé l'efficacité des antibiotiques dans le traitement de la syphilis. Ils étudient notamment en pathologie humaine ou expérimentale la rapide disparition des tréponèmes dans les lésions, les modifications dans leur morphologie, l'évolution des tests humoraux et, *in vitro*, l'action de tel antibiotique sur la vitalité du germe.

La question actuellement posée sur l'existence de souches devenues résistantes est placée sur un autre plan. A vrai dire, il n'y a pas de preuve que *Treponema pallidum* perde ou atténue sa sensibilité au cours de l'antibiothérapie. Les arguments invoqués dans ce sens sont justiciables de critiques. Une nouvelle manifestation clinique peut relever de différentes causes : doses de pénicilline défectueuses, métabolisme anormal de celle-ci par absorption insuffisante ou élimination trop rapide. Les phénomènes de séro-résistance enfin sont bien malaisés à interpréter, en raison même de l'imprécision des motifs propres à modifier le taux des anticorps.

(\*) Manuscrit reçu le 10 novembre 1958.

Aussi l'étude de la résistance de souches de tréponèmes devait-elle être placée sur le plan expérimental et *in vitro*. On se heurte malheureusement à l'impossibilité actuelle de cultiver *Treponema pallidum* ; il était naturel d'envisager le problème en utilisant un tréponème facilement cultivable non pathogène, tel le tréponème de Reiter. On sait que ses antigènes constitutifs sont employés dans la sérologie de la syphilis avec une grande sensibilité, ce qui témoigne déjà de certaines analogies avec *Treponema pallidum*.

Il y a quelques mois ce sujet fut également abordé par Mutermilch et Gérard [4]. Ces auteurs avaient choisi le tréponème de Reiter en invoquant les mêmes motifs que nous aujourd'hui sur la similitude de constitution antigénique. Leurs recherches personnelles ont eu pour objet d'éprouver le comportement du Reiter vis-à-vis des principaux antibiotiques et d'établir une comparaison à cet égard avec le tréponème pâle.

Dans notre travail nous avons étudié, par différentes techniques, la seule action de la pénicilline sur le Reiter pour déterminer si le parasite est susceptible d'acquérir une résistance *in vitro* vis-à-vis de cet antibiotique. Après avoir rapporté nos recherches, nous signalerons les constatations de différents auteurs sur des points analogues ou voisins.

#### I. — MÉTHODE DES CONTACTS PROLONGÉS ET DES PASSAGES SUCCESSIFS.

##### 1° Recherche de la bactériostase.

La technique utilisée est très simple : des quantités variables de pénicilline sont introduites dans des séries de tubes contenant 9 cm<sup>3</sup> de milieu de Brewer additionné de 1 cm<sup>3</sup> de sérum stérile de cheval. On ensemence ensuite ces tubes très largement avec 0,5 cm<sup>3</sup> d'une culture de tréponème de Reiter de 4 à 6 jours. Tous les tubes sont mis à l'étuve à 37°.

Les résultats sont lus et notés entre le sixième et le huitième jour, mais on conserve les tubes au-delà de ce délai. L'expérience nous a bien montré, en effet, que la bactériostase provoquée par la pénicilline peut se prolonger assez longtemps et néanmoins la culture reprend toutes ses activités à des dates tardives : quinze, vingt, vingt-cinq jours. Certains effets seraient inexactement appelés bactéricides si l'observation était arrêtée trop hâtivement. Nous pensons devoir insister tout particulièrement sur ce point.

Nous avons utilisé dans les expériences de la pénicilline G Specia dont un flacon de 100 000 unités est additionné de 5 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique. A partir de cette solution-mère, on prépare des dilutions successives dont 1 cm<sup>3</sup> est ajouté à 10 cm<sup>3</sup> de milieu de Brewer. On obtient ainsi des concentrations finales par centimètre cube variant de 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,3, 0,5... 1 unité. Tous les tubes sont ensemencés avec des quantités égales de Tr. Reiter : 0,5. Le tube contenant la

dose la plus forte de pénicilline permettant le développement du Reiter est utilisé pour un nouveau passage dans les mêmes conditions techniques.

Nous avons pratiqué ainsi 15 passages successifs sans avoir pu mettre en évidence aucune preuve de la résistance *progressive* à l'antibiotique. Les doses bactériostatiques, en évaluant les résultats à six ou huit jours de l'incubation à 37°, ont toujours oscillé entre 0,1 et 0,15 unité par centimètre cube. Faisant une moyenne des doses *maxima* permettant, après stase momentanée, le développement des cultures dans les délais indiqués plus haut, on note 0,14 unité par centimètre cube, ce qui correspond à 0,085 µg de pénicilline. Si la moyenne est calculée sur la quantité la plus élevée de l'antibiotique ayant permis le développement de la culture dans des délais dépassant huit jours et pouvant en atteindre 28, le chiffre est alors de 0,26 unité par centimètre cube ou 0,156 µg.

Dans ces expériences de passages successifs, le Tr. Reiter utilisé devient une souche entretenue habituellement en milieu pénicilliné. Aussi avons-nous fait parallèlement des épreuves de tolérance avec des Tr. Reiter neufs, n'ayant jamais eu de contact avec l'antibiotique.

Le plus généralement et aux mêmes doses, la culture neuve pousse avec un retard qui peut, dans certains cas, être très marqué.

Le tableau I reproduit quelques protocoles.

TABLEAU I.

Souche entretenue avec la pénicilline	Souche neuve
0,1 U/cm <sup>3</sup> pousse 8 <sup>e</sup> jour	0,1 U./cm <sup>3</sup> pousse 15 <sup>e</sup> jour
0,2 " " 14 <sup>e</sup> "	0,2 " " 27 <sup>e</sup> "
0,1 U/cm <sup>3</sup> pousse 7 <sup>e</sup> jour	0,1 U./cm <sup>3</sup> pousse 8 <sup>e</sup> jour
0,2 " " 13 <sup>e</sup> "	0,2 " " 26 <sup>e</sup> "
0,35 " " 22 <sup>e</sup> "	0,35 " ne pousse pas
0,1 pousse dès 48 heures	0,1 aucun développement

Si l'on établit pour le tréponème neuf la dose bactériostatique maxima moyenne ayant permis à la culture de pousser en huit jours, on la situe à 0,093 unité par centimètre cube, ce qui correspond en poids à 0,0558 µg en calculant l'unité à 0,6 µg.

En tenant compte pour cette moyenne des délais prolongés ayant permis la culture des souches neuves au-delà de la limite de huit jours et pouvant en atteindre 27, la dose bactériostatique maxima se trouve alors au taux de 0,22 unité par centimètre cube, soit 0,132 µg.



De tels chiffres ne font ressortir que de minimes différences entre les tréponèmes ayant vécu en milieu pénicilliné et ceux n'ayant encore jamais eu de contact avec l'antibiotique.

### 2° Recherche de la bactéricidie.

Dans nos protocoles, la dose bactéricide de pénicilline fut étudiée soit par la méthode des contacts *continus*, soit par la technique des contacts *momentanés*. Dans le premier cas furent ensemencés des tubes pénicillinés à doses variables avec des cultures de Tr. Reiter entretenues depuis plusieurs mois en milieu pénicilliné à 0,1 unité ou 0,06  $\mu\text{g}$ . Le développement de la culture fut observé jusqu'à 0,6 unité, soit 0,36  $\mu\text{g}$ . Encore ne se fit-il qu'après une longue période de stase (jusqu'à vingt jours). Au-dessus de cette dose aucun développement ne se produisit. Il y a *bactéricidie*.

Si parallèlement on emploie une souche neuve de quatre jours, la dose maxima de pénicilline permettant encore, après avoir franchi une longue période de stase (jusqu'à vingt-cinq jours), le développement de la culture se situe à 0,5 unité par centimètre cube, soit 0,3  $\mu\text{g}$ . Au-delà de cette dose, la bactéricidie est obtenue et aucun développement n'est noté. L'écart paraît donc réduit, d'après cette technique, entre la dose bactéricide pour le tréponème cultivé en milieu pénicilliné et la dose observée pour le tréponème neuf.

Afin de préciser la dose létale sur un spirochète Reiter neuf, des contacts de vingt-quatre heures à 37° furent effectués avec des doses variables de pénicilline, réalisant une gamme allant d'une unité à 10 000 unités par centimètre cube. Une centrifugation rapide était effectuée après ce contact et était suivie d'un lavage en sérum physiologique et d'un repiquage sur milieu neuf de Brewer. Notons, d'abord, que l'examen au fond noir des culots de centrifugation montrait la présence de spirochètes encore mobiles à toute dose, même à 10 000 unités par centimètre cube. Sans doute étaient-ils peu nombreux aux doses les plus élevées, mais sans qu'il fût possible d'établir une proportionnalité précise entre le taux de pénicilline et l'aspect de la culture au fond noir, après le contact de vingt-quatre heures. Le résultat du repiquage en *milieu neuf* permit de noter pour 2 unités un développement de la culture en quarante-huit heures, à 10 unités en cinq jours. Pour aucune dose supérieure l'ensemencement ne donna de résultat. Ainsi apparaît-il que la dose bactéricide se trouve située, après contact limité de vingt-quatre heures, à un chiffre beaucoup plus élevé que lorsqu'est employée la technique des contacts continus à 37°.

Cette constatation nous amena à étudier particulièrement la sensibilité du Reiter par la méthode des contacts momentanés.

## II. — MÉTHODE DES CONTACTS MOMENTANÉS.

En comparaison des résultats observés par la culture du Tr. Reiter d'une façon continue dans des milieux pénicillinés à doses variables, il convenait d'étudier ce qu'il advenait lorsque le contact avec l'antibiotique était momentané.

Pour cela, nous avons envisagé parallèlement le comportement de Tr. Reiter neufs, n'ayant jamais été influencés par la pénicilline, et celui de tréponèmes entretenus depuis longtemps et régulièrement en milieux pénicillinés.

Sur 5 cm<sup>3</sup> de l'une et de l'autre de ces cultures, on met des doses variables de l'antibiotique. Les tubes sont placés à l'étuve pendant des temps allant d'une à six heures ; ils sont ensuite centrifugés à grande vitesse et le culot spirochétien est ensemencé en milieu de Brewer.

Nous avons pratiqué 10 séries d'expériences, qui toutes ont abouti à des résultats analogues. Les Tr. Reiter entretenus régulièrement sur milieu pénicilliné supportent le nouveau contact de l'antibiotique et poussent sans aucune période de stase dans les tubes de réensemencement. Tout au contraire, le Reiter neuf, pour le même temps de contact et les mêmes doses de pénicilline, ne donne une culture qu'avec un retard considérable, témoin les protocoles suivants (tableau II).

TABLEAU II.

Culture entretenue avec la pénicilline Contact de 3 heures	Culture neuve Contact de 3 heures
0,1 U./cm <sup>3</sup> = aucune stase	0,1 U./cm <sup>3</sup> = stase 13 jours
0,2 " " = " "	0,2 " " = " 14 "
0,2 U./cm <sup>3</sup> = aucune stase	0,2 U./cm <sup>3</sup> = stase 9 jours
0,4 " " = " "	0,4 " " = " 15 "
0,8 " " = " "	0,8 " " = " 17 "
0,2 U./cm <sup>3</sup> = aucune stase	0,2 U./cm <sup>3</sup> = stase 13 jours
0,4 " " = stase 8 jours	0,4 " " = " 14 "
0,6 " " = " 12 "	0,6 " " = " 18 "
1 " " = " 16 "	1 " " = " 23 "

Nous nous bornerons à ces exemples, les résultats étant toujours comparables. D'une manière générale, il n'y a pas ou très peu de stase pour le développement de la culture entretenue en milieux pénicillinés et quand le culot centrifugé est réensemencé en milieu de Brewer. Pour la culture neuve témoin traitée de la même manière, l'arrêt de développement (la stase) est d'environ de neuf à treize jours pour les plus faibles doses de pénicilline et atteint dix-sept, dix-neuf, vingt-trois jours pour les taux de 0,6, 0,8 et 1 unité.



Nous retrouverons ces mêmes chiffres dans de nombreux autres protocoles, confirmant bien la différence qu'il y a dans le comportement des deux cultures. Nous concluons donc sur ce point en disant que pour les Tr. Reiter entretenus en milieux pénicillinés, les contacts momentanés avec cet antibiotique n'entraînent pas ou peu de bactériostase lors des réensemencements en milieux neufs. Au contraire, les tréponèmes témoins offrent une phase d'attente plus ou moins longue pendant laquelle les germes d'apport restent immobilisés et prennent des aspects globuleux. La culture repart ensuite et reprend sa pleine activité.

Pour établir le comportement parallèle des Tr. Reiter neufs et de ceux cultivés avec l'antibiotique, il est nécessaire d'utiliser des cultures *jeunes* et du *même âge*. Notre expérimentation a bien montré que les cultures âgées présentent au repiquage des délais d'attente souvent assez considérables avant de se développer. Il convient de toujours utiliser des cultures n'ayant pas dépassé cinq jours.

Nos protocoles sur les contacts momentanés n'ont pas établi de différences manifestes pour des variations de séjour à l'étuve d'une à six heures. L'effet produit par l'antibiotique paraît donc être hâtif et ne pas augmenter nettement dans les délais plus prolongés de l'expérience.

Il ressort de l'ensemble de ces constatations que si les doses bactériostatiques ou bactéricides de la pénicilline ne sont pas très différentes pour Tr. Reiter habitué à vivre avec l'antibiotique et pour le tréponème neuf, par contre le développement des cultures de ces deux variétés accuse, dans les délais où il se produit, de fortes dissemblances soulignant l'acquisition d'un comportement nouveau.

Au terme « habitué » il conviendrait de substituer, d'après M. Chabbert, celui de « tolérant », la tolérance étant la *sélection* dans une population bactérienne, de germes capables de pousser à des concentrations subinhibitrices.

### III. — ACTION DE LA PÉNICILLINE SUR LES CULTURES.

Dans cette technique, des tubes de Brewer sont ensemencés avec des tréponèmes provenant d'un milieu pénicilliné. Au troisième jour de la culture on ajoute une dose de pénicilline de 0,1 par centimètre cube ; aucune bactériostase ne se produit ; à 0,2 unité par centimètre cube, il y a arrêt momentané et vers le sixième jour, le développement se poursuit. Si l'on opère parallèlement avec une culture neuve de même âge en ajoutant au troisième jour une dose de pénicilline de 0,1 unité par centimètre cube, les tréponèmes s'immobilisent, et dans le protocole aucun développement ne se produit en dix jours.

Une autre expérience montre que si l'on ajoute 0,1 unité de pénicilline par centimètre cube à une culture de Reiter accoutumée à cet antibiotique, il ne se produit qu'une stase très temporaire et, à partir du huitième jour, le développement est très abondant. Au contraire, la culture neuve à laquelle on a ajouté la même dose de pénicilline montre une immobilisation des parasites. La stase persiste vingt jours avant que la culture affirme sa croissance.

On retrouve donc, par cette technique, des signes distinctifs dans le comportement des deux types de culture.

#### IV. — NOMBRE DE CONTACTS NÉCESSAIRES.

Il est malaisé de préciser le nombre de contacts nécessaires pour rendre le Tr. Reiter tolérant à l'antibiotique. Signalons que trois contacts successifs de vingt-quatre heures avec 0,1 ou 0,2 unité de pénicilline, séparés chacun par un passage sur milieu neuf, n'ont fait acquérir aucune propriété de tolérance : le repiquage a été suivi, en effet, d'une période de stase de sept jours comme pour le témoin neuf. Par contre, un Tr. Reiter entretenu depuis trente-sept jours sur milieu pénicilliné à 0,1 unité par centimètre cube supporte au sixième passage des doses de pénicilline plus élevées que le témoin neuf.

##### Exemples :

Un Tr. Reiter entretenu avec l'antibiotique donne en dix jours une culture à 0,2 par centimètre cube, tandis que le neuf n'a montré aucun développement.

Un tréponème tolérant au dixième passage après contact avec 0,1 unité donne une culture en huit jours ; avec 0,15 unité en onze jours ; avec 0,2 en treize jours, tandis que le Tr. Reiter neuf cultive pour les mêmes doses en onze, quinze et vingt-six jours.

Pour chercher les conditions dans lesquelles se produisent des phénomènes de tolérance à la pénicilline, des contacts furent effectués d'abord avec des doses faibles de pénicilline, 0,01 unité, pour élever progressivement, aux passages ultérieurs, le taux de l'antibiotique. A partir du quatrième passage, la différence était manifeste entre le Tr. Reiter ainsi transféré quatre fois en milieu pénicilliné et le tréponème neuf.

##### En témoignent les protocoles suivants :

*Quatrième passage*, soit seize jours après le premier contact, le tréponème tolérant cultive en huit jours à la dose de 0,1 unité par centimètre cube et en quatre jours pour la dose de 0,04. Au contraire, en dix-huit jours, aucun développement du tréponème neuf témoin n'est encore visible à la dose de 0,1. Ce développement apparaît à la dose de 0,04 en neuf jours.



*Sixième passage*, soit trente et un jours après le premier contact, le tréponème tolérant donne en quarante-huit heures à la dose de 0,1 unité par centimètre cube un développement caractéristique qui se retrouve à 0,2 unité par centimètre cube le dixième jour, à 0,4 le treizième jour. Le tréponème neuf, au contraire, ne cultive pas, après vingt jours d'observation, à 0,1, 0,2 et 0,4 unité, mais cultivé à la dose de 0,04 après stase de onze jours.

Dans ces recherches, nous n'avons pu faire augmenter de façon pertinente le taux de la résistance à la pénicilline ; si, comme nous l'avons déjà noté, on ne peut parler de formes ayant acquis une *pénicillino-résistance* vraie, il est par contre certain que rapidement, et par un petit nombre de passages, s'établit un comportement très différent entre le tréponème devenu tolérant et le tréponème neuf.

#### V. — PERTE DE LA TOLÉRANCE.

La question posée était de savoir si les qualités offertes par les Tr. Reiter, quand ils sont habituellement cultivés en milieu pénicilliné, représentaient des propriétés nouvelles fixées pour la souche.

Des milieux pénicillinés à 0,2, 0,4, 0,8 unité par centimètre cube ont été ensemencés simultanément :

1° Avec un spirochète habitué à vivre au contact de la pénicilline depuis plusieurs mois ;

2° Avec un Tr. Reiter de même condition, mais repiqué une fois avant l'expérience sur milieu non pénicilliné ;

3° Avec un Tr. Reiter neuf.

Le contact est assuré pendant trois heures à 37°. Après une centrifugation prolongée, le culot est réensemencé sur milieu neuf. Les résultats notés ont été les suivants :

*Tréponème tolérant* : absence de stase pour les trois doses employées.

*Tréponème ayant subi un repiquage en milieu neuf* : il n'y eut aucune stase à 0,2 unité, mais elle fut de sept et douze jours pour 0,4 et 0,8 unité de pénicilline.

*Tréponème témoin neuf* : la culture ne pousse à 0,2 qu'en neuf jours, en quinze jours pour 0,4 et dix-sept jours pour 0,8 unité.

Dans un autre protocole, la technique fut la même, mais le Tr. Reiter cultivé avec la pénicilline fut préalablement repiqué à deux reprises sur milieu neuf. Là encore on voit que le repiquage a fait disparaître en grande partie les propriétés précédemment offertes. Le tréponème, en effet, se comporte à peu près comme la souche neuve, alors que le parasite toujours cultivé avec l'antibiotique pousse sans stase à des doses qui entraînent pour le tréponème neuf ou pour le tréponème préalablement repiqué deux fois, des délais de treize, dix-huit et vingt-trois jours avant que la culture ne reparte.



Ainsi apparaîtrait-il que les propriétés conférées au Tr. Reiter par sa culture habituelle en milieu pénicilliné peuvent s'atténuer quand on introduit un ou plusieurs passages sur milieu neuf. On obtiendrait ainsi une souche ayant des propriétés *intermédiaires* entre la souche tolérante à l'antibiotique et la souche neuve témoin.

Cette constatation toutefois n'est pas absolue et nous avons noté des résultats contradictoires. En effet, une culture entretenue depuis quatre mois en milieu pénicilliné à 0,1 par centimètre cube a été transférée quatre fois successives sur milieu neuf, réalisant ensuite un contact de trois heures d'étuve avec 0,1 unité de pénicilline par centimètre cube. L'ensemencement du culot de centrifugation donnait aussitôt une culture, tandis que la souche neuve témoin en contact pendant le même temps avec la même dose d'antibiotique ne s'est développée que le treizième jour.

Un résultat presque analogue fut obtenu en passant six fois successives sur un milieu neuf un Tr. Reiter jusque-là habitué à vivre régulièrement en milieu pénicilliné.

Un contact fut établi pendant trois heures avec 0,1 unité de l'antibiotique. Le culot de centrifugation, réensemencé en milieu de Brewer, donna une culture après une courte stase de quarante-huit heures. Parallèlement, le tréponème n'ayant pas subi de lavage, toujours cultivé avec la pénicilline, se développe sans aucune stase et dès l'ensemencement.

Ces protocoles, contrairement aux précédents, tendraient donc à témoigner en faveur d'une certaine persistance, plus ou moins grande d'ailleurs, des qualités d'un tréponème régulièrement cultivé en milieu pénicilliné.

Il est difficile d'interpréter cette discordance. Nous estimons qu'il faut incriminer sans doute l'âge forcément un peu différent des cultures dans les divers protocoles et, par suite, l'action dissemblable de la pénicilline sur le métabolisme d'un germe offrant des aspects morphologiques si variés.

On peut encore envisager le problème en utilisant une technique de lavage.

Elle consiste à établir un contact de trois heures à l'étuve avec 0,2 de pénicilline en employant comparativement une souche neuve et une souche vivant habituellement en milieu pénicilliné. Après le contact, le culot est lavé à l'eau physiologique et le réensemencement effectué ensuite sur milieu neuf. Le tréponème tolérant pousse sans aucune période de stase, elle est au contraire de sept jours pour le tréponème neuf. Un seul lavage ne suffit donc pas à faire perdre les propriétés acquises. D'ailleurs, si ce lavage est répété six fois sur le culot de centrifugation d'un tréponème habitué après contact de trois heures, l'ensemencement de ce culot en milieu neuf pousse sans stase,

au même titre que le tréponème témoin habitué à vivre avec l'antibiotique n'ayant pas subi le lavage. Quant au tréponème neuf ayant également supporté le contact momentané de trois heures, le développement de la culture ne se fait qu'après un retard de huit jours.

## VI. — MORPHOLOGIE.

Au cours de nos expériences réalisant des contacts continus ou momentanés avec la pénicilline, nous avons remarqué la fréquence avec laquelle on observe des spirochètes bien mobiles de taille anormalement longue. Ils ont plusieurs fois la grandeur

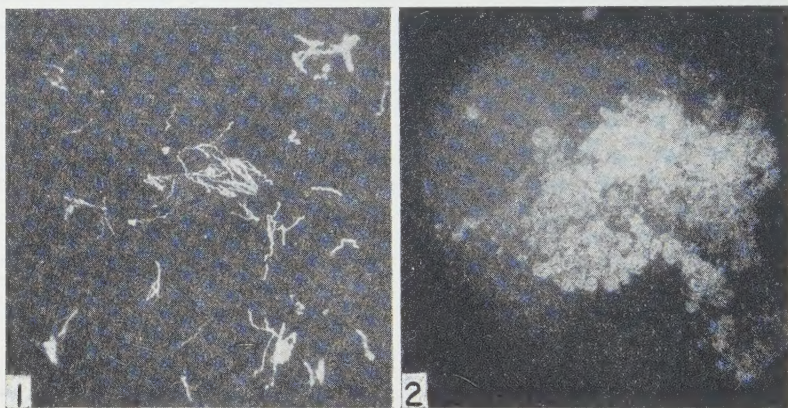


FIG. 1. — Spirochètes normaux.  $\times 800$ .

FIG. 2. — Amas de boules.  $\times 800$ .

du parasite habituel. S'unissant bout à bout ils forment parfois de très longs filaments ayant généralement perdu leur tour de spire, de façon plus ou moins complète, tout en conservant leurs ondulations générales. Ils sont susceptibles de traverser dans leur

FIG. 3. — Spirochètes longs avec petites formations kystiques en boules.  $\times 1\,600$ .

FIG. 4. — Culture pénicillinée. Spirochètes de forme longue.  $\times 800$ .

FIG. 5. — Spirochètes de forme longue.  $\times 800$ .

FIG. 6. — Agglutinat de spirochètes dans un tube pénicilliné visible à l'œil nu.  $\times 48$ .

FIG. 7. — Spirochètes, formes longues, culture pénicillinée. Ecrasement d'un agrégat visible à l'œil nu.  $\times 800$ .





longueur une grande partie du champ microscopique au fond noir. On a nettement l'impression que la pénicilline a provoqué l'inhibition du mécanisme de la division transversale. Il arrive que ces longs spirochètes s'enroulent les uns autour des autres formant des *torsades* animées de mouvements. Il est aisé d'observer la libération d'un ou de plusieurs parasites constituant la torsade.

Ces formes longues apparaissent après deux ou quatre jours d'étuve à 37° en milieu pénicilliné permanent à 0,1 ou 0,2 unité par centimètre cube jusqu'à la dose bactéricide maxima tolérée. Mais il faut remarquer que, lorsqu'est réalisé un contact momentané avec la pénicilline pendant trois à six heures d'étuve et que le culot centrifugé est repiqué en milieu neuf, on peut noter la rapide apparition de formes anormalement longues (fig. 3, 4, 5).

Dans les milieux pénicillinés, on observe aussi des spirochètes extrêmement fins, très peu spiralés, granuleux, d'aspect pous-sièreux.

Certes, on connaît des spirochètes de très longue taille dans des cultures de Reiter ayant vieilli, même en dehors de tout contact avec la pénicilline, mais ils sont généralement peu nombreux et toujours d'apparition tardive. Nous ne les avons jamais observés dans des délais aussi rapides que lorsque l'antibiotique a pu agir de façon permanente ou momentanée.

Il faut signaler enfin que l'immobilisation du tréponème en milieu pénicilliné présente des degrés différents; elle peut être totale et absolue, ce qui ne signifie d'ailleurs pas la mort du parasite. Dans cet état, en effet, un réensemencement en milieu neuf peut offrir un développement normal.

L'immobilité, d'autre part, peut ne toucher qu'une partie du tréponème envisagé individuellement, une des extrémités étant encore animée de légers mouvements. C'est là souvent un stade transitoire, soit que l'immobilisation totale s'achève, soit, au contraire, que la récupération complète de la mobilité se fasse. Ainsi les aspects successifs d'une même culture examinée à quelques heures de distance feraient porter des appréciations fort différentes (fig. 6 et 7).

Par ailleurs, on remarque dans les tubes d'ensemencement de petits agrégats visibles à l'œil nu, à la manière d'une petite colonie. Examinés au fond noir, ils sont essentiellement constitués par un feutrage de formes longues. A la périphérie de cet agglomérat on observe aisément quelques-unes de ces formes qui s'en évadent et, animées de mouvements, offrent rapidement des *divisions transversales* pour donner des spirochètes de taille habituelle.

Lorsque les cultures ont une phase de stase plus ou moins prolongée suivant la dose de pénicilline du milieu, on observe d'abord des formations kystiques, des « boules » constituant souvent des plages étendues. Elles paraissent bien être formées uniquement par l'enroulement des spirochètes de l'ensemencement (fig. 2). Un peu plus tard

ou même simultanément, les formes longues agglomérées apparaissent, précédant la reprise active de la culture.

Il resterait à interpréter la manière dont se constituent ces agrégats de formes longues. Il est logique de penser qu'elles représentent une morphologie spéciale prise surtout par les tréponèmes de l'apport sous l'influence de la pénicilline. C'est une phase végétative d'attente. Ainsi, les formes longues du Tr. Reiter ne sont souvent que transitoires et la même culture, vue à vingt-quatre ou quarante-huit heures de distance, peut ne plus en présenter. Avec l'épuisement de la pénicilline dans le milieu, il n'y a plus inhibition du mécanisme de division et, dès lors, des tréponèmes de taille et de morphologie habituelles constituent l'aspect normal de la culture en pleine pousse.

Il est à remarquer que l'action de la pénicilline sur l'apparition des formes longues se produit d'autant plus aisément que la souche utilisée dans l'expérience est une souche neuve.

Ainsi voit-on, après vingt-quatre heures de contact avec 0,002 unité de pénicilline, apparaître des formes anormalement longues si l'expérience est faite avec un tréponème neuf. Au contraire, avec un tréponème tolérant, il faut au moins 0,01 unité pour que l'apparition de ces formes soit constatée.

Ce fait souligne encore la différence de comportement apparaissant si nettement entre le Tr. Reiter, cultivé ou non, au contact avec l'antibiotique.

Pour étudier les déformations morphologiques que les hautes doses de pénicilline peuvent produire sur les Tr. Reiter, nous avons mis 1 cm<sup>3</sup> d'une culture neuve en contact avec 100 000 unités de pénicilline G.

Trois heures après, l'immobilisation n'est pas totale, mais on note l'effacement des tours de spire. Vingt-quatre heures après, se remarquent des plages de désintégration plus ou moins complète ; entre elles se trouvent des tréponèmes immobiles longs et non spiralés, d'autres, filamenteux, très fins et poussiéreux. Trois jours après, l'aspect est le même, avec augmentation des zones désintégrées.

Au cinquième jour, il y a dissolution ; l'aspect du milieu est celui d'une bouillie blanchâtre et on ne peut plus discerner aucune forme spirochétienne.

Utilisant des doses bien moindres, soit 5 unités par centimètre cube, on note essentiellement au fond noir des plages des formes kystiques en « boules », l'absence de tréponèmes, mobiles ou non, sauf quelques aspects très fins en voie de destruction. A cette dose, il n'y a aucune formation de tréponèmes de taille anormalement longue. Ceux-ci restent la caractéristique des taux de pénicilline de 0,1 ou 0,2 par centimètre cube, la limite d'action de l'antibiotique paraissant être de 0,002.

## VII. — DISCUSSION.

Les résultats obtenus dans nos expériences doivent maintenant être comparés à ceux des différents auteurs qui ont abordé également l'étude des effets de la pénicilline sur le Tr. Reiter ou d'autres tréponèmes de culture.

Nous avons déjà signalé le travail récent de Mutermilch et Gérard ; nous avons utilisé une technique analogue à la leur pour tout ce qui concerne les contacts prolongés. Ces auteurs appellent dose bactériostatique minima la plus faible quantité de pénicilline permettant, dans leur gamme d'expériences, le développement de la culture après sept jours d'incubation à 37°. Ils la situent à 0,3 unité. Remarquons que si la gamme des doses était prolongée à des chiffres inférieurs, le taux de 0,3 unité serait appelé bactériostatique *maximum*, puisque, au-dessus de ce chiffre, il n'y avait plus de développement dans les délais d'observation. Mutermilch et Gérard ont échoué, comme nous, dans leur tentative pour créer des races pénicillino-résistantes.

Au même moment, Vyaseleva [2] estime qu'il suffit de 0,015 unité pour mettre en évidence l'action bactériostatique de la pénicilline, mais à condition que le contact soit prolongé plusieurs jours. Cet auteur signale, d'autre part, que la sensibilité du Tr. Reiter à la pénicilline peut, au cours de passages successifs, être tantôt augmentée, tantôt non modifiée.

En 1950, Vandeputte [3] étudie sur le Reiter l'action des antibiotiques, note la formation de granules et insiste sur le fait que la croissance peut être empêchée, sans que la mobilité soit modifiée.

Un travail intéressant est publié par Scarpa [4] en 1949. Dans ses recherches, il a pu établir que l'effet bactériostatique de la pénicilline sur la souche Reiter se situe entre 0,01 et 0,03 unité. Au-dessus de ces doses aucun développement n'est noté. Quant à l'effet bactéricide, en trois heures de contact et en jugeant les résultats d'après l'*immobilisation* des tréponèmes, il est observé pour des doses de 5 000 et 7 000 unités au centimètre cube. Si le contact est poursuivi vingt-quatre heures, l'immobilisation des tréponèmes est obtenue dans les tubes contenant 400 à 600 unités. L'auteur remarque que la lyse n'est pas provoquée, même à des doses beaucoup plus fortes. Nous-mêmes ne l'avons observée qu'en établissant le contact avec 100 000 unités et en cinq jours.

Il nous apparaît qu'il est difficile d'apprécier le pouvoir bactéricide de l'antibiotique par le seul fait de l'immobilisation. Ce ne peut être qu'une phase transitoire et le repiquage est nécessaire pour apprécier l'état réel de la culture.

Eagle et Musselman [5] estiment que l'effet bactériostatique sur le Tr. Reiter s'observe à la concentration de 0,016  $\mu$ g par centimètre cube. La dose double, 0,032  $\mu$ g, représente la concentration minima bactéricide en vingt-quatre heures. L'effet maximum est produit à une concentration de 0,025  $\mu$ g à 1  $\mu$ g, mais un accroissement même de deux mille fois la concentration de pénicilline accélère de façon insignifiante la vitesse avec laquelle les germes sont tués.



L'article de Tsun Tung et Frazier [6], consacré à la sensibilité du Tr. Reiter à la pénicilline, situe la dose bactériostatique après trois jours d'étuve à 0,125 unité par centimètre cube. Ils remarquent qu'une haute concentration (100 unités par centimètre cube) n'immobilise pas entièrement les germes. Eux aussi n'ont obtenu aucune modification dans la sensibilité, malgré 15 passages successifs. Ils notent la présence de spirochètes très longs pouvant atteindre 100 et 150  $\mu$ . Ils estiment que ces formes longues ne possèdent pas de flagelles. Ils remarquent leur apparition après deux ou trois jours d'incubation à 37° dans des cultures contenant 0,125 unité par centimètre cube. C'est dans des délais analogues que nous avons observé de telles formes dans nos protocoles.

Le problème des formes longues du Tr. Reiter soumis à la pénicilline a été étudié au microscope électronique par Morton et Oskay [7], en utilisant la souche Nichols cultivable. Ces formes apparaissent en présence de 0,005 unité de pénicilline par centimètre cube. Avec 0,02 unité de cet antibiotique les résultats sont analogues, mais à 0,01 la longueur redevient normale. La pénicilline provoque donc des divisions incomplètes. Ces auteurs constatent des flagelles sur les tréponèmes de culture anormalement longs.

En 1953, Morton et Ford [8] reprennent cette étude sur les cultures des souches Nichols et Reiter. Une modification marquée dans la morphologie est évidente en utilisant des doses subtréponémostatiques de pénicilline, soit 0,004 unité par centimètre cube. Il y a allongement des cellules au contact de cette dose. A cet égard donc, ces tréponèmes cultivables ressemblent aux bactéries pénicillino-sensibles. Notons que ces auteurs, d'autre part, estiment que la dose de 0,078 unité par centimètre cube ne permet pas le développement après quatre jours d'incubation à 37°. C'est à 0,15 unité par centimètre cube qu'apparaîtrait la dose bactéricide.

On ne manquera pas de remarquer les différences trouvées par les auteurs pour évaluer la dose bactériostatique ou bactéricide de la pénicilline pour le Tr. Reiter. Certes les techniques employées ne sont pas toutes identiques. Le critérium de l'action létale varie, si on le juge à l'immobilisation ou si on exige le caractère négatif d'un repiquage d'épreuve. Les délais d'observation sont d'importance primordiale et, trop courts, peuvent faire porter une appréciation erronée. Enfin l'écart entre les chiffres relatés par les auteurs semble souvent attribuable à l'âge de la culture du Tr. Reiter utilisée dans les contacts dans les milieux pénicillinés. C'est une culture de trois ou quatre jours et en plein développement qui est la plus appropriée pour l'épreuve.

Il faut retenir enfin que les souches employées par les différents auteurs ne sont peut-être pas toutes identiques entre elles.

Au moment où nous expérimentons les contacts momentanés du Tr. Reiter avec la pénicilline, nous entendons avec intérêt la commu-

nication de Videau à la Société Française de Microbiologie du 6 février 1958.

Cet auteur a étudié le phénomène de fixation des antibiotiques dans les bactéries.

Rappelons qu'en utilisant de la pénicilline marquée par un atome de  $^{35}\text{S}$ , Rowley, Cooper et Roberts [40], puis Cooper et Rowley [41] avaient antérieurement observé que la pénicilline se fixe, mais qu'un traitement préalable avec la pénicilline non marquée prévient le phénomène.

Cooper, Rowley et Dawson [42] démontrèrent que cette fixation se fait sur les germes en métabolisme actif. Videau a précisé la quantité d'antibiotique fixée : elle est égale à la quantité totale de cet antibiotique mis en contact, moins la somme des quantités retrouvées dans le culot et le surnageant. La pénicilline se caractérise par une fixation rapide et définitive sur les corps microbiens. La quantité disparue, c'est-à-dire fixée, serait en relation avec la sensibilité du germe à l'antibiotique et la dose mise en contact, mais elle ne varie pas avec la durée de celui-ci.

Les recherches de Videau faites sur *Staphylococcus aureus* 209 P, menées comparativement avec divers antibiotiques, n'offrent que de très relatives comparaisons avec notre travail. Nous n'avons pu présentement effectuer les titrages biologiques différentiels nécessaires pour dire, le cas échéant, la quantité de pénicilline qui serait peut-être fixée sur le tréponème et les quantités retrouvées dans le surnageant et le culot.

Les recherches effectuées sur la sensibilité du Tr. Reiter à la pénicilline sont à comparer aux conclusions qui découlent des travaux étudiant ce même problème pour le tréponème pâle. Mais l'absence de culture de ce dernier a surtout dirigé les investigations sur l'activité de l'antibiotique *in vivo*.

Mutermilch et Gérard [4] montrent que les antibiotiques sans activité dans la syphilis en sont également dépourvus vis-à-vis du Tr. Reiter. Dans ce groupe se placent : soframycine, viomycine, polymyxine, néomycine, tyrothricine, streptomycine. Au contraire, les antibiotiques comme : pénicilline, érythromycine, magnamycine, terramycine, rovamycine, tétracycline, chloromycétine, bacitracine, auréomycine, doués d'un pouvoir antibiotique certain dans la syphilis humaine et expérimentale, sont également actifs vis-à-vis du Reiter.

De nombreuses recherches furent poursuivies sur l'hypothèse d'une résistance acquise du tréponème pâle à la pénicilline.

Les travaux menés sur la sensibilité *in vitro* ne pouvaient être conduits que dans une période extrêmement courte, limitée par la survie des germes. Des concentrations très fortes de pénicilline étaient nécessaires pour l'immobilisation des tréponèmes en quelques heures. Ainsi en est-il dans le travail de Bessemans et Derom [43] en 1948.

Des investigations faites *in vivo*, nous retiendrons les expériences suivantes. Hollander et Turner [44] ont montré qu'un traitement pénicilliné, à doses subcuratives, prolongé vingt semaines consécutives,

ne pouvait amener la production d'une résistance médicamenteuse du spirochète chez le lapin infecté immédiatement avant. Pendant toute la durée de cette thérapeutique substérilisante, on ne pouvait constater l'apparition ni de symptômes, ni de manifestations sérologiques ; bien plus, aucune modification immunologique ne s'était établie, puisque, dès l'arrêt de cette pénicillinothérapie, des lésions se développèrent dans des délais pareils à ceux que l'on aurait observés si l'animal avait été seulement inoculé au moment même où la médication avait été suspendue. D'autre part, la stérilisation ultérieure de l'infection, apparue ainsi tardivement, avait nécessité les mêmes doses que celles utilisées pour des lapins témoins syphilités, mais n'ayant pas été en contact avec la pénicilline. Il semble donc que cet antibiotique, à doses subcuratives, n'avait eu qu'un effet de stase sur le développement des germes, sans déterminer l'apparition ni d'une infection inapparente, ni d'une résistance médicamenteuse du tréponème pâle.

En 1953, Probey [15] tenta également et vainement de modifier la sensibilité des tréponèmes pâles à la pénicilline. Il infecta successivement des lapins par voie endoveineuse et testiculaire avec des suspensions de tréponèmes mises en contact *in vitro* avec cet antibiotique et administra une heure après cette inoculation une dose unique mais subcurative de pénicilline. Malgré quatre passages successifs de tréponèmes prélevés chez ces animaux ainsi préparés, c'est-à-dire tréponèmes ayant subi un double contact *in vitro* et *in vivo*, il ne réussit pas davantage à obtenir une résistance du germe à l'antibiotique.

Un très réel progrès dans ces investigations fut apporté en 1954 par Ellen Nell [16], qui a publié un mémoire riche en documents. L'auteur utilise les milieux permettant une survie prolongée de *Treponema pallidum* virulent et des spirochètes voisins (pian, bejel), ce qui permet d'étendre la période d'observation.

En milieu de survie, Ellen Nell [16] estime l'efficacité de la pénicilline sur la mobilité du tréponème pâle *in vitro*, après contact de dix-huit heures à 35° à des concentrations de pénicilline G cristallisée se rangeant entre 0,0001 et 0,01  $\mu\text{g}$  par centimètre cube.

L'efficacité sur les tréponèmes d'une concentration donnée de pénicilline n'est pas influencée par une variation cinq ou six fois plus forte dans le nombre des germes constituant l'inoculum. Il n'a pas été noté de différence dans la sensibilité à la pénicilline, selon que les souches étudiées aient été de tréponème pâle, du pian ou du bejel.

Dans une série de 10 tests d'immobilisation par effet de la pénicilline, le point maximum de l'immobilisation apparut entre 0,001  $\mu\text{g}$  et 0,003  $\mu\text{g}$  de pénicilline par centimètre cube.

Une intéressante observation fut faite par Ellen Nell : avec une concentration de pénicilline entre 0,1  $\mu\text{g}$  et 0,50  $\mu\text{g}$  par centimètre cube, il y a toujours une période approximative de quatre heures avant qu'un effet sur la mobilité du tréponème puisse être noté. Cette période de latence augmente cependant parallèlement, au fur et à mesure que la concentration de pénicilline est réduite au-dessous de 0,1  $\mu\text{g}$  par centimètre cube. Il est donc impossible de sidérer le germe avant un temps minimum de quatre heures. A partir d'une certaine dose de pénicilline (0,1 à 0,50  $\mu\text{g}$ ), les délais du début d'immobilisation sont



pratiquement *incompressibles* et l'immobilisation totale est obtenue au même moment.

Nous rapprocherons, de ce fait, notre constatation sur les contacts d'une souche Reiter avec 100 000 unités de pénicilline : l'immobilisation, encore très incomplète la troisième heure, devint totale vingt-quatre heures après.

En restant dans le domaine de l'expérimentation *in vitro*, il apparaît que les résultats obtenus sur la sensibilité à la pénicilline du tréponème de Reiter se superposent à ceux relatés sur le comportement, à l'égard de cet antibiotique, du tréponème pâle en milieu de survie.

D'autre part, apparaît suggestive la notion du comportement d'un Tr. Reiter *tolérant* « habitué » à vivre en milieu pénicilliné, se développant dans des conditions propres à retarder ou inhiber la culture du tréponème neuf.

#### RÉSUMÉ.

Pour étudier la sensibilité du tréponème de Reiter à la pénicilline, il faut utiliser des cultures jeunes de 3 ou 4 jours.

Les résultats doivent être notés au huitième jour de l'incubation à 37°, en contact avec l'antibiotique. Mais l'effet de la pénicilline peut se prolonger plus longtemps et cependant la culture est susceptible de repartir.

Une observation arrêtée trop hâtivement peut être interprétée à tort comme un effet bactéricide.

L'immobilisation du tréponème n'autorise pas à conclure à la mort du parasite : il est susceptible de redonner une culture en milieu neuf.

Sous ces réserves et dans ces conditions la dose bactériostatique a été dans nos protocoles de 0,10 à 0,15 unité (0,14 en moyenne, soit 0,085  $\mu\text{g}$  par centimètre cube).

En effectuant 15 passages successifs, on n'a pu observer aucun témoignage de l'acquisition d'une résistance progressive à la pénicilline.

Les épreuves de sensibilité faites avec un Tr. Reiter n'ayant jamais été au contact de l'antibiotique montrent que cette souche ne pousse, aux mêmes doses de pénicilline, qu'avec un retard très marqué sur le développement du Tr. Reiter tolérant à un milieu pénicilliné.

La dose bactéricide pour un tréponème cultivé en milieu pénicilliné se situe à 0,6 unité ou 0,36  $\mu\text{g}$ . Pour un tréponème neuf, elle se trouve à 0,5 ou 0,3  $\mu\text{g}$ . Cette dose est nettement plus forte lorsque le contact est limité à vingt-quatre heures.

La méthode, consistant à effectuer des contacts d'une à six heures avec des doses variables d'antibiotique, montre que le Tr. Reiter tolérant pousse sans stase après repiquage en milieu neuf. Au contraire, le tréponème neuf accuse une période de latence de neuf, treize, quinze jours avant que la culture prenne son aspect en pleine activité. L'effet produit par la pénicilline apparaît hâtif, décelable dès la première

heure de contact, sans qu'il augmente de façon appréciable dans les autres délais de l'expérience.

Si les doses bactériostatiques ou bactéricides ne diffèrent pas sensiblement pour des cultures de *Tr. Reiter* entretenu ou non avec de la pénicilline, il est par contre évident que, vis-à-vis d'une même dose de l'antibiotique, le comportement de chacune de ces deux cultures est très dissemblable dans les délais respectifs où le développement se produit et aussi lors d'un repiquage en milieu neuf.

Cette dissemblance apparaît nettement encore en ajoutant une dose de pénicilline de 0,1 unité par centimètre cube à chacune de ces cultures. Aucune bactériostase ne s'observe pour le tréponème tolérant, ou elle est très brève. Pour le tréponème neuf, elle est d'environ dix jours et peut se prolonger jusqu'à vingt jours.

Il nous est difficile de préciser actuellement les délais nécessaires à l'acquisition de cette tolérance : trente-sept jours pour des contacts permanents successifs et plus de trois contacts de vingt-quatre heures avec 0,1, 0,2 unité, séparés chaque fois par un passage sur milieu neuf.

La recherche de la perte de la tolérance a donné des résultats divergents : les uns en faveur de l'atténuation ou de la perte de cette tolérance lorsqu'on introduit dans l'expérience un ou plusieurs passages sur milieu neuf. Les autres témoigneraient, au contraire, en faveur d'une certaine persistance des propriétés acquises. De faibles différences dans l'âge des cultures utilisées expliquent, sans doute, l'action dissemblable de la pénicilline sur le métabolisme du germe.

Au cours de nos divers protocoles il a été facile d'observer les modifications morphologiques que peuvent offrir les tréponèmes soumis à l'action de l'antibiotique : plages de forme kystique en boules, fréquence de tréponèmes très longs témoignant d'une inhibition de la division transversale. Ces formes longues apparaissent trois à cinq jours après contact à 37° avec 0,1, 0,2 unité de pénicilline par centimètre cube. Mais elles apparaissent aussi très vite après des contacts momentanés de trois à six heures et repiquage en milieu neuf. On note aussi la fréquence de tréponèmes très fins, très peu spiralés, granuleux, d'aspect poussiéreux. Ces formes anormales, connues dans les vieilles cultures, apparaissent après l'action de la pénicilline dans des délais courts et témoignent de l'action de l'antibiotique.

L'immobilité des tréponèmes en milieu pénicilliné présente des degrés différents : elle peut être totale, chaque parasite étant immobile ; tantôt elle n'est que partielle : de légers mouvements peuvent persister aux extrémités du tréponème. Ce n'est souvent qu'un stade transitoire, l'immobilisation pouvant se généraliser ou au contraire la récupération de la mobilité peut se faire. D'où les aspects successifs d'une même culture susceptibles de faire porter des appréciations fort différentes.

Le *Tr. Reiter* peut supporter pendant trois heures 100 000 unités, sans que l'immobilisation soit totalement obtenue. Après un contact de vingt-quatre heures avec 10 000 unités, l'examen au fond noir du culot de centrifugation montre la présence de tréponèmes parfaitement mobiles, mais en très petit nombre.

## CONCLUSIONS.

1° Une culture de tréponème de Reiter habituée à vivre en milieu pénicilliné est nettement dissemblable d'une culture de tréponème neuf, lors d'un contact avec cet antibiotique.

2° Le tréponème de Reiter n'a pu donner, après 15 passages successifs, une race pénicillino-résistante progressive et manifeste.

3° Pour cette raison, nous utilisons le terme *habitude* ou mieux *tolérance* et non celui de *résistance* par comparaison au sens donné à ce mot pour les germes pyogènes surtout.

4° La dissemblance entre un tréponème Reiter tolérant ou non à la pénicilline apparaît peu dans le taux de la dose bactériostatique ou bactéricide pour l'un ou pour l'autre, mais par contre est évidente dans le comportement respectif de chacun, lors de son développement en milieu pénicilliné ou non.

5° La pénicilline favorise l'apparition très rapide de formes anormalement longues et de formes fines et granuleuses.

6° Elle inhibe le mécanisme de la division transversale du parasite.

7° On ne peut juger le pouvoir bactéricide de la pénicilline sur l'immobilité provoquée des tréponèmes.

## SUMMARY

COMPORTMENT OF REITER'S TREPONEMA  
IN PENICILLIN CONTAINING MEDIA.

The comportment of a culture of Reiter Treponema adapted to penicillin is quite different from that of an ordinary culture, when treated with penicillin.

Even after 15 transfers in presence of penicillin, the Reiter Treponema does not show an actual penicillino-resistance. Consequently the author uses the word « habit » or tolerance, to differentiate the comportment of Reiter Treponema from that of pyogeneous microorganisms.

There is no great difference between normal or tolerant Reiter Treponema as to the bacteriostatic or bactericidal dose but the two germs behave quite differently in a penicillin containing medium.

The presence of penicillin in the medium rapidly allows the development of very elongated forms and of thin and granular forms. It inhibits transversal division of the Treponema.

The bactericidal activity of penicillin cannot be estimated by immobility of Treponema.



## BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUTERMILCH (S.) et GÉRARD (M<sup>me</sup> S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 435.
  - [2] VYASELEVA. *J. Microbiol.* (en russe), 1957, n° 4, 106. In *Bull. Inst. Pasteur*, 1957, 3800.
  - [3] VANDEPUTTE. *Rev. Belge Path. Med. exp.*, 1950, **20**, 368.
  - [4] SCARPA (C.). *Riv. Ist. sieroter. ital.*, 1949, **24**, 244.
  - [5] EAGLE (H.) et MUSSELMAN (D.). *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 99.
  - [6] TSUN TUNG (M. D.) CHESTER (N.) et FRAZIER (M. D.). *Am. J. Syph.*, 1946, **30**, 205.
  - [7] MORTON (H.) et OSKAY. *Am. J. Syph.*, 1950, **34**, 34.
  - [8] MORTON (H. E.) et FORD (W. T.). *Am. J. Syph.*, 1953, **37**, 529.
  - [9] VIDEAU (D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 709.
  - [10] ROWLEY (D.), COOPER (P. D.) et ROBERTS (C.). *Biochem. J.*, 1950, **46**, 157.
  - [11] COOPER (P. D.) et ROWLEY (D.). *Nature*, 1949, **163**, 480.
  - [12] COOPER (P. D.), ROWLEY (D.) et DAWSON (I. M.). *Nature*, 1949, **164**, 842.
  - [13] BESSEMANS et DEROM. *Rev. Belge Pathol. Med. exp.*, 1948, **18**, 385.
  - [14] HOLLANDER (D. H.), TURNER (Th. B.). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1952, **90**, 105.
  - [15] PROBEY (T. F.). *Am. J. Syph.*, 1953, **37**, 369.
  - [16] NELL (E.). *Am. J. Syph.*, 1954, **38**, 92.
-

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU TRÉPONÈME DE REITER

par S. MUTERMILCH, M<sup>me</sup> S. GÉRARD  
et M. DELAVILLE (\*).

(Laboratoire Central de Biologie  
du Centre Psychiatrique Sainte-Anne)

Deux d'entre nous ont montré dans un travail précédent [1] que les antibiotiques doués d'un pouvoir thérapeutique certain dans la syphilis de l'homme et des animaux de laboratoire étaient également actifs vis-à-vis du tréponème de Reiter, et que le degré de sensibilité du tréponème de Reiter et du tréponème de Schaudinn était sensiblement le même pour les divers antibiotiques étudiés.

D'autre part, les antibiotiques inactifs dans la syphilis se sont montrés dépourvus de pouvoir bactériostatique vis-à-vis du Tr. de Reiter.

Le travail actuel a pour but d'élucider les questions suivantes .

I. Est-il possible de créer des races antibiotico-résistantes de Tr. de Reiter ?

II. Quelles sont les modifications morphologiques que subissent les Tr. de Reiter sous l'action des antibiotiques ?

III. Quel est le mécanisme de l'action bactéricide des antibiotiques *in vivo* sur le Tr. de Reiter ?

IV. Quelle est l'action bactériostatique de divers agents minéraux actifs dans la syphilis sur le Tr. de Reiter ?

### I. — ESSAIS DE CRÉATION DE RACES ANTIBIOTICO-RÉSISTANTES DU TR. DE REITER.

La technique employée consistait en repiquages multiples et successifs des souches de Tr. de Reiter, ayant donné une croissance faible en présence des doses actives limites de l'antibiotique choisi. Ces repiquages étaient effectués sur le milieu de Brewer additionné de doses de plus en plus fortes de cet antibiotique. Les trois antibiotiques suivants ont été expérimentés : la pénicil-

(\*) Manuscrit reçu le 26 novembre 1958.

line comme la plus active, et le chloramphénicol et l'auréomycine comme les moins actifs.

1° *Pénicilline* : Aucune résistance accrue n'a été constatée après cinq repiquages successifs effectués à huit jours d'intervalle.

2° *Chloramphénicol* : Aucune résistance accrue n'a été constatée après dix-sept repiquages successifs, à des intervalles variant de trois à sept jours.

3° *Auréomycine* : Même résultat négatif après dix repiquages à des intervalles variant de trois à sept jours. Par conséquent, il semble que le Tr. de Reiter est incapable de s'adapter à la présence de l'antibiotique dans le milieu de culture et de créer ainsi des races antibiotico-résistantes.

Le Tr. de Reiter se comporte donc, à ce point de vue, comme *Tr. pallidum* : en effet, l'observation clinique n'a pas permis de mettre en évidence des souches pénicillino-résistantes au cours des traitements de la syphilis par la pénicilline.

Chez le lapin également, les expériences de Probey [2] et de Nichols, Buerk, Ford et Beerman [3] ont montré l'impossibilité d'obtenir, chez cet animal, des souches pénicillino-résistantes.

De leur côté, Keller et Morton [4] ont échoué dans leurs tentatives de rendre les tréponèmes de Nichols et de Reiter résistants à l'action de l'érythromycine.

Il existe donc une différence fondamentale entre la stabilité des tréponèmes de Reiter et de Schaudinn vis-à-vis des antibiotiques, et la plasticité de divers spirilles et trypanosomes, lesquels s'adaptent rapidement à l'action bactéricide des anticorps et des arsénicaux, et créent facilement des races résistantes spécifiques.

## II. — MORPHOLOGIE DU TR. DE REITER SOUmis A L'ACTION DE LA PÉNICILLINE.

Des tubes de milieu de Brewer sont additionnés de quantités variables de pénicilline et ensemencés avec des Tr. de Reiter en déposant, au fond du tube, quelques gouttes d'une culture plus ou moins âgée.

L'examen des tréponèmes s'effectue à l'ultramicroscope, à des intervalles variables, les tubes étant gardés à l'étuve à 37°.

Ces expériences ont été répétées de nombreuses fois et il a été constaté que les résultats obtenus ne variaient que légèrement, selon l'importance de l'inoculum ensemencé, la dose de l'antibiotique et l'âge de la culture employée. Le processus de la destruction des tréponèmes se poursuit, en général, de la façon suivante :

1° Une à huit heures après le début de l'expérience, la mobilité des tréponèmes est parfaitement conservée et analogue à celle des tréponèmes du tube témoin sans pénicilline.



2° Vingt-quatre heures après, la majorité des tréponèmes du tube pénicilliné sont immobiles, tandis que la minorité ont conservé leur mobilité normale ou ralentie. Les germes immobiles ont, en général, un aspect normal, quoique certains d'entre eux se présentent sous forme allongée (tréponèmes géants), déjà signalée par Galperin [5] et par Tung et Frazier [6], ou sous forme de germes bouclés à une ou à deux extrémités.

3° Deux à trois jours après, on découvre encore quelques tréponèmes faiblement mobiles, tous les autres étant immobiles et souvent enroulés à l'une ou à leurs deux extrémités ; on constate, en même temps, des points brillants dans le corps de certains tréponèmes immobiles.

4° Après le quatrième ou le cinquième jour, on ne découvre plus de tréponèmes vraiment mobiles ; seuls quelques-uns d'entre eux peuvent présenter encore de légers mouvements de spires et parfois des contractures brusques de quelques spires, surtout à leurs extrémités. Le nombre de germes enroulés augmente.

5° A partir du sixième jour, l'immobilité des tréponèmes est totale, leur forme brillante disparaît progressivement et, les jours suivants, ces germes n'apparaissent plus que sous l'aspect d'ombres ; cependant, on n'assiste pas à une lyse totale des tréponèmes.

La morphologie des Tr. de Reiter soumis à l'action de la pénicilline ne diffère pas essentiellement de celle des tréponèmes de Reiter morts spontanément dans les cultures âgées. En effet, lorsqu'on examine à l'ultramicroscope des cultures âgées respectivement de 21, de 28, de 33 et de 44 jours, on observe les images suivantes :

*Cultures âgées de 21 et de 28 jours :* Les tréponèmes sont en majorité immobiles, mais ils ont conservé leur forme normale.

Toutefois, de légères contractures de spires s'observent chez certains d'entre eux et des repiquages sur un milieu frais donnent encore des cultures positives. On constate, en même temps, la présence des tréponèmes bouclés à une ou aux deux extrémités de leur corps et des points brillants à l'intérieur des germes.

*Cultures âgées de 33 et de 44 jours :* Tous les tréponèmes sont immobiles. Repiquages négatifs. Présence de tréponèmes bouclés et de corps sphériques libres ou pourvus d'un court flagelle.

Ces images sont, à peu de chose près, identiques à celles décrites dans les cultures âgées par Galperin [5], qui pense que les corps sphériques sont probablement des kystes. Nous inclinons plutôt à penser qu'il ne s'agit pas ici de kystes, mais de tréponèmes enroulés, consécutivement à la modification de la membrane et à la perte de son élasticité.

Par conséquent, la seule différence entre les tréponèmes pro-

venant des cultures âgées et ceux qui ont été soumis à l'action de la pénicilline consiste en accélération de la mort des germes en présence de cet antibiotique : dans le premier cas (cultures âgées), l'immobilisation et les modifications morphologiques s'obtiennent en vingt à quarante jours, tandis que dans le deuxième cas (pénicilline), tout est terminé entre le troisième et le cinquième jour.

Dès lors, le problème suivant se pose : comment se fait-il que, *in vitro*, trois à cinq jours de contact avec la pénicilline soient nécessaires pour aboutir à l'immobilisation totale des tréponèmes, tandis que, *in vivo*, leur mort survient beaucoup plus rapidement, comme il a été constaté par de nombreux auteurs.

Ainsi, par exemple, Mahomey, Arnold et Harris [7], auxquels on doit la découverte de l'action thérapeutique de la pénicilline dans la syphilis, constatent, chez le lapin, la disparition des tréponèmes dans le chancre, seize heures après l'injection de la pénicilline. D'après Levaditi [8] les tréponèmes du chancre de lapin commencent à s'immobiliser à partir de la neuvième heure.

D'autres auteurs donnent des chiffres variant entre trois et vingt-quatre heures.

Il est donc évident que l'organisme intervient dans le processus de destruction des tréponèmes par la pénicilline. La plupart des auteurs admettent que la pénicilline bloque l'équipement enzymatique servant à la synthèse des protides indispensables à la croissance et à la division (Levaditi) et que les tréponèmes ainsi lésés deviennent la proie facile des leucocytes ; d'autres auteurs soupçonnent, en plus, un autre mécanisme encore ignoré.

Nous avons ainsi été amenés à aborder le problème du mécanisme de l'action bactéricide de la pénicilline *in vivo*.

### III .— MÉCANISME DE L'ACTION BACTÉRICIDE DE LA PÉNICILLINE *in vivo*.

Les recherches de Levaditi et de ses collaborateurs, résumées dans l'excellente thèse de Nicolau [9], ont montré que divers sels d'arsenic, d'antimoine, de bismuth et de vanadium, dépourvus d'action trypanocide et spirillicide *in vitro*, mais actifs *in vivo*, peuvent être activés dans un tube à essai, par addition d'extraits cellulaires, et principalement d'extrait de *foie*.

Les expériences exposées ci-dessous ont donc eu pour objet l'étude du rôle stimulateur éventuel de divers organes sur la pénicilline vis-à-vis du Tr. de Reiter.

EXPÉRIENCE I. — Par voie intramusculaire, on injecte 500 000 U. I. de pénicilline à un lapin. Il est saigné à blanc le lendemain après qu'on a prélevé un peu de sang à la veine de l'oreille. Des frag-

ments de foie, de rate et de rein, d'un poids approximatif de 1 g, prélevés stérilement, sont placés au fond des tubes contenant le milieu de Brewer et ces tubes sont ensemencés avec une culture de Tr. de Reiter âgée de cinq jours et placés à l'étuve à 37°. Les cultures sont ensuite examinées à l'ultramicroscope à des intervalles variables. Le tableau I montre les résultats obtenus.

TABLEAU I.

Tube	Organe	4 heures après	24 heures après	48 heures après
I	Foie	Majorité des Tr. immobiles ou faibl. mobiles. Tr. bou- clés et ombres de Tréponèmes.	Tous immobi- les	Tous immo- biles.
II	Rate	Mobiles	Mobiles ou faibl. mobiles	Majorité im- mobiles
III	Rein	Mobiles	Mobiles	Mobiles
IV	Sérum	Mobiles	Mobiles	Mobiles
V	Témoin	Mobiles	Mobiles	Mobiles

Cette expérience montre que les tréponèmes mis en contact avec un fragment de foie d'un lapin pénicilliné commencent à s'immobiliser et à s'enrouler dès la quatrième heure et sont complètement détruits en vingt-quatre heures. Le rein et le sérum se montrent inactifs, tandis que la rate n'agit qu'après vingt-quatre à quarante-huit heures de contact. Il va sans dire que le foie et la rate d'un lapin normal non pénicilliné, non seulement n'empêchent pas la multiplication des tréponèmes, mais au contraire favorisent leur développement.

Ajoutons qu'avec un fragment de foie pénicilliné ne pesant que 0,1 g, l'immobilisation des tréponèmes n'est obtenue qu'à partir de la quarante-huitième heure.

Il y a donc une différence marquée entre l'action de la pénicilline seule, qui ne détruit la totalité des tréponèmes qu'entre le troisième et le cinquième jour, et celle du foie pénicilliné, qui commence à immobiliser les tréponèmes vers la quatrième heure et les détruit totalement en vingt-quatre heures.

EXPÉRIENCE II. — *Action de l'extrait du foie sur la pénicilline.*  
Un lapin est saigné à blanc. On prélève stérilement un gros fragment de foie qu'on broie dans un mortier. On ajoute, petit



à petit, deux fois le poids d'organe d'eau physiologique. On centrifuge et on décante le liquide surnageant.

L'extrait de foie ainsi obtenu est mélangé, à parties égales, avec avec une solution de pénicilline. Le mélange est placé à l'étuve à 37° pendant quatre heures. On ajoute ensuite 1 cm<sup>3</sup> du mélange à 9 cm<sup>3</sup> de milieu de Brewer, et on ensemence, en déposant au fond du tube quelques gouttes d'une culture de six jours de Tr. de Reiter. Les tubes témoins contiennent, soit la même dose de pénicilline seule, soit l'extrait du foie seul (tableau II).

TABLEAU II.

Tube:	5 H. après	24 H. après	48 Heures	72 Heures
I	Extrait du foie + 0,5 UI de pénicilline	Mobiles Tous immobiles, mais très rares Tr légèrement oscillants apparition des Tr. bouclés	Tous immobiles. Ombres de tréponèmes de tréponèmes	Ombres de tréponèmes
II	Extrait du foie + 2 UI de pénicilline	Grande majorité immobiles. Apparition des tréponèmes bouclés	Tous immobiles. Ombres de tréponèmes	Ombres de tréponèmes
III	Pénicilline seule 0,5 UI	Mobiles Majorité immobiles minorité mobiles	Majorité immobiles mobiles. Minorité faiblement mobiles	Majorité immobiles Très rares nettement mobiles
IV	Pénicilline seule 2 UI	Mobiles Majorité immobiles minorité mobiles	Majorité immobiles mobiles. Minorité faiblement mobiles	Tous immobiles
V	Extrait du foie seul	Mobiles	Mobiles	Mobiles culture
VI	Témoin	Mobiles	Mobiles	Mobiles culture

Cette expérience montre que les mélanges de l'extrait du foie et de pénicilline commencent à immobiliser les tréponèmes à partir de la cinquième heure et que tous les tréponèmes deviennent immobiles vingt-quatre heures après la mise en contact.

La pénicilline seule, dans les mêmes conditions expérimentales, commence à immobiliser les tréponèmes à partir de la vingt-quatrième heure, mais des tréponèmes mobiles sont encore présents quarante-huit heures ou soixante-douze heures après.

Lorsqu'on compare ce résultat avec celui de l'expérience précédente, on constate que le foie fraîchement isolé d'un lapin pénicilliné agit plus vite sur les tréponèmes en les détruisant presque complètement en quatre heures, tandis que l'extrait de foie + pénicilline demande au moins vingt-quatre heures pour les immobiliser totalement. Cette différence peut s'expliquer par l'extraction insuffisante du principe actif du foie par la technique employée.

Quoi qu'il en soit, on peut affirmer que le foie stimule l'action de la pénicilline sur les tréponèmes.

Quel est le mécanisme de ce phénomène ? S'agit-il d'une combinaison entre une substance de provenance hépatique et la pénicilline, ou d'une sensibilisation des tréponèmes par cette substance et une action ultérieure de la pénicilline, ou d'un tout autre mécanisme, tel que la formation d'un métabolite très actif de la pénicilline par la cellule hépatique ?

De nombreuses expériences seront nécessaires, pour élucider ce problème que nous nous proposons d'aborder dans un très proche avenir. Parmi les substances en cours d'étude, la *lécithine* nous a fourni quelques résultats intéressants.

#### IV. — ACTION DE DIVERS AGENTS MINÉRAUX SUR LE TRÉPONÈME DE REITER.

Le Tr. de Reiter étant sensible aux mêmes antibiotiques et au même degré que le Tr. de Schaudinn, nous nous sommes demandé si le même parallélisme pouvait être observé en ce qui concerne l'action de divers agents minéraux.

Les sels de mercure, d'arsenic, de bismuth, d'or, de vanadium et d'étain ont été expérimentés.

##### 1° Sels de mercure.

EXPÉRIENCE I. — On se sert d'une solution de cyanure de mercure contenant 1 cg dans 1 cm<sup>3</sup> d'eau aux concentrations définitives suivantes contenues dans 10 cm<sup>3</sup> de milieu de Brewer par milligramme : 0,5 ; 0,25 ; 0,06 ; 0,03 ; 0,015 et 0,007 mg.

Les tubes sontensemencés avec le Tr. de Reiter, en déposant au fond du tube quelques gouttes de culture.

##### RÉSULTAT.

HgCN. . . .	1 mg	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03	0,015	0,0075
Tr. de Reiter.	—	—	+	++	+++	+++	+++	+++

Par conséquent le cyanure de mercure empêche la multiplication des tréponèmes à la concentration de 0,25 mg (environ).

EXPÉRIENCE II. — Même dispositif que dans l'expérience précédente, mais avec le *sublimé*.

Cl <sub>2</sub> Hg . . . . .	1 mg	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03
Tr. de Reiter. . . . .	—	+	++	++	+++	+++

Par conséquent l'action bactériostatique du sublimé est, à peu de chose près, égale à celle du cyanure de mercure.

## 2° Sels d'arsenic.

EXPÉRIENCE I. — On expérimente le *stovarsol sodique Specia* (*m*-acétylamino-*p*-hydroxyphényl-arsénate de sodium).

Doses définitives employées : 10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,6 mg.

### RÉSULTAT.

Stovarsol . . . . .	10	5	2,5	1,25	0,6
Tr. de Reiter. . . . .	—	+	+	++	+++

Par conséquent l'action bactériostatique du stovarsol se situe entre 1 et 2 mg par centimètre cube.

EXPÉRIENCE II. — Action de l'*acétylarsan Specia* (*m*-acétylamine-*p*-hydroxyphénylarsénate de diéthylamine).

Concentrations définitives en milligrammes par centimètre cube : 2,36 ; 1,18 ; 0,59 ; 0,29 ; 0,14.

### RÉSULTAT.

Acétylarsan. . . . .	2,36	1,18	0,59	0,29	0,14
Tr. de Reiter . . . . .	—	+	+	++	+++

Par conséquent l'action bactériostatique limite de l'acétylarsan se situe entre 0,30 et 0,60 mg par centimètre cube.

## 3° Sels de bismuth.

EXPÉRIENCE I. — On expérimente le *bismutho-propanol-sulfonate de sodium* de Lumière.

Concentrations définitives en milligrammes employées : 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,12 ; 0,06 ; 0,03.

### RÉSULTAT.

Sel de bismuth. . . . .	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03
Tr. de Reiter. . . . .	—	—	—	+	++	+++

Par conséquent l'action bactériostatique de ce sel de bismuth se situe entre 0,06 et 0,12 mg par centimètre cube. Il est à noter



que le thiopropanol sulfonate de sodium, *sans bismuth*, est dépourvu de toute action bactériostatique, même à la dose considérable de 10 mg par centimètre cube.

EXPÉRIENCE II. — On expérimente le *bismuthotartrate de sodium et de potassium*.

Doses employées : 0,1 ; 0,05 ; 0,025 mg par centimètre cube.

Sel de bismuth . . . . .	0,1	0,05	0,025
Tr. de Reiter. . . . .	—	—	+

Par conséquent la dose limite active du bismuthotartrate de sodium et de potassium est de 0,025 mg par centimètre cube.

4° *Sels d'or* : On expérimente l'*allochrysine* Lumière (aurothiopropanol sulfonate de sodium). Doses employées : 1,25 ; 0,62 ; 0,31 ; 0,15 ; 0,075 ; 0,037 mg.

#### RÉSULTAT.

Allochrysine . . . . .	1,25	0,62	0,31	0,15	0,075	0,037
Tr. de Reiter . . . . .	—	—	+	+	++	+++

Par conséquent la dose bactériostatique limite d'allochrysine se situe à environ 0,15 mg par centimètre cube.

5° *Sels de vanadium* : On expérimente le chlorure de vanadium. Doses employées : 0,5 ; 0,25 ; 0,12 ; 0,06 mg par centimètre cube.

#### RÉSULTAT.

Chlorure de vanadium . . . . .	0,5	0,25	0,12	0,06
Tr. de Reiter . . . . .	—	—	+	+++

Par conséquent la dose bactériostatique limite du chlorure de vanadium est de 0,12 mg par centimètre cube.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'examiner l'action bactériostatique d'un élément inactif dans la syphilis. On a choisi le *chlorure stanneux*, qui s'est montré complètement inactif à la dose de 1 mg par centimètre cube.

*En résumé*, tous les sels actifs dans la syphilis se montrent également actifs vis-à-vis du Tr. de Reiter. Ce dernier semble donc pouvoir servir de test pour l'étude de l'action thérapeutique de divers sels dans la syphilis. Le seul inconvénient de cette méthode réside en la formation, dans certains cas, d'un précipité dans le milieu de culture employé, ce qui rend parfois la lecture

des résultats difficile. Toutefois, ce précipité ne s'observe qu'en présence de très fortes doses des sels, et il est absent dans les tubes contenant des doses faibles, mais encore actives vis-à-vis du Tr. de Reiter.

Il nous a paru intéressant de calculer, pour chacun de ces produits, la quantité réelle de métal ou de métalloïde actif correspondant à la dose bactériostatique limite de la substance expérimentée.

Nous avons ainsi trouvé les valeurs suivantes :

Cyanure de mercure . . . . .	0,25 mg,	Hg . . .	0,22 mg.
Chlorure mercurique . . . . .	0,25 mg,	Hg . . .	0,18 mg.
Stovaryl . . . . .	1 mg,	As . . .	0,27 mg.
Acétylarsan . . . . .	0,6 mg,	As . . .	0,12 mg.
Allochrysine . . . . .	0,15 mg,	Au . . .	0,05 mg.
Bismuthopropanol sulfonate de sodium . . . . .	0,06 mg,	Bi . . .	0,015 mg.
Tartro-bismuthate de Na et de K . . . . .	0,025 mg,	Bi . . .	0,012 mg.
Chlorure de vanadium . . . . .	0,12 mg,	V . . .	0,05 mg.

On peut ainsi remarquer l'activité à peu près équivalente du mercure et de l'arsenic se situant autour de la valeur 0,20 mg par centimètre cube ; celle, plus grande, de l'or, 0,05 mg par centimètre cube, et, enfin, la supériorité du bismuth, dont la dose active, 0,01 mg par centimètre cube, est absolument identique, qu'il s'agisse du bismuthiopropanol sulfonate de sodium, ou du tartrobismuthate de sodium et de potassium.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Levaditi et coll. [10] dans leur étude du mécanisme de l'action chimiothérapique du bismuth et de l'or dans la syphilis expérimentale du lapin. Leurs conclusions sont les suivantes :

1° Le bismuth est plus toxique que l'or (3 p. 1) ;

2° Le bismuth est plus actif au point de vue curatif : il agit à la dose de 0,002 g à 0,001 g par kilogramme de l'animal, tandis que l'or agit à la dose de 0,005 g par kilogramme : le rapport est donc de 5 à 1. Or, nos expériences, *in vitro*, ont donné également la proportion de 5 pour 1 si l'on compare l'action bactériostatique du bismuth et de l'or.

#### CONCLUSIONS.

1° La création de races de Tr. de Reiter antibiotico-résistantes semble irréalisable *in vitro*.

2° Les modifications morphologiques que subissent les Tr. de Reiter sous l'action de la pénicilline sont analogues à celles que montrent les tréponèmes des cultures âgées.

3° Le foie semble jouer un rôle important dans l'action tréponémocide de la pénicilline *in vivo*.

4° Divers agents minéraux (mercure, arsenic, bismuth, or et vanadium) agissent sur le Tr. de Reiter au même degré que sur le Tr. de Schaudinn.

### SUMMARY

#### CONTRIBUTION TO THE STUDY OF REITER'S TREPONEMA.

1. It seems impossible to obtain *in vitro* antibiotico-resistant strains of Reiter Treponema.
2. The morphological alterations induced in Reiter Treponema by penicillin are similar to those observed in old Treponema cultures.
3. Liver tissue seems to play an important part in the treponemcid activity of penicillin *in vivo*.
4. Different agents (Hg, As, Bi and Va) have the same activity on Reiter Treponema as on Schaudinn Treponema.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] MUTERMILCH (S.) et GÉRARD (M<sup>me</sup> S). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 435.
  - [2] PROBEY. *Am. J. Syph.*, 1953, **37**, 369.
  - [3] NICHOLS, BUERK, FORD et BEERMAN. *Arch. int. Med.*, 1950, **85**, 305.
  - [4] KELLER et MORTON. *Am. J. Syph.*, 1953, **37**.
  - [5] GALPERIN (A.). *Am. J. Syph.*, 1949, **33**, 101.
  - [6] TUNG et FRAZIER. *Am. J. Syph.*, 1946, **30**, 215.
  - [7] MAHONEY, ARNOLD et HARRIS. *J. ven. Dis.*, 1943, **24**, 355.
  - [8] LEVADITI (C.). *La pénicilline et ses applications thérapeutiques*. Masson et C<sup>ie</sup>, édit., Paris, 1945.
  - [9] NICOLAU (S.). *Thèse Fac. Sci.*, Paris, 1925. Impr. Barnéoud, Laval.
  - [10] LEVADITI (C.), COQUOIN (R.), KRASSNOFF (M<sup>lle</sup> D.) et MANIN (M<sup>lle</sup> Y.). *Bull. Soc. Franç. Dermatol.*, 1933, n° 8, 1433.
-



## ÉTUDE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE DES RHUMATISMES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES

par J.-C. FRANCO, A. EYQUEM, L. PODLIACHOUK  
et F. JACQUELINE (\*).

(Institut Pasteur,  
Laboratoire d'Hématologie et des Groupes sanguins  
[Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE])

Les rhumatismes inflammatoires chroniques s'accompagnent de modifications des constituants sériques, révélables par deux grands groupes de méthodes : physico-chimiques (électrophorèse, ultracentrifugation [5]) et sérologiques (réaction d'agglutination des particules sensibilisées [3, 4, 8, 10]).

Au contraire du sérum normal, qui présente à l'ultracentrifugation, dans le groupe des globulines de poids moléculaire élevé, deux protéines de constante S 20<sup>w</sup> 19 et 28 (cette dernière correspondant vraisemblablement à la properdine), le sérum de polyarthrite chronique évolutive (P. C. E.) possède souvent une protéine supplémentaire de constante 22 S, dissociable *in vitro* en deux composants 19 S et 7 S (Kunkel), ayant pour poids moléculaire 900 000 et 160 000.

Cette singularité du sérum de P. C. E. devait nous engager à le soumettre à l'analyse immuno-électrophorétique, qui permet une étude fine des sérums présentant des anomalies physico-chimiques analogues [macroglobulinémie (Burtin, Grabar [4]) ou immunologiques voisines, comme le lupus érythémateux disséminé (Seligmann [41]).

La méthode immuno-électrophorétique a déjà été appliquée à l'étude de la P. C. E. (Sheiffarth et Gotz [42]) à l'aide d'immunsérums anti-sérum humain normal.

Cleve et Hartmann [2] ont réalisé, sur le sérum de 8 malades atteints de P. C. E., une étude immuno-électrophorétique à l'aide d'un immunsérum de lapin anti-sérum normal et d'un immunsérum anti-sérum P. C. E. ; ils ont obtenu 14 arcs de précipitation spécifiques correspondant à ceux du sérum normal et

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 6 novembre 1958.

conclu, par épuisement partiel de leur anti-sérum spécifique, à une augmentation des globulines  $\alpha_2$  et  $\beta$ .

L'étude comparative des résultats des méthodes sérologiques et immuno-électrophorétiques devait être précieuse pour la mise en évidence d'anomalies spécifiques, car un pourcentage notable de malades atteints de P. C. E. présentent des réactions sérologiques négatives surtout chez l'enfant.

Ce travail a donc pour but de préciser les caractères immuno-électrophorétiques des substances responsables des réactions sérologiques et de les rechercher chez les malades présentant des réactions sérologiques négatives, bien que cliniquement atteints de P. C. E.

#### MATÉRIEL.

Notre étude a porté sur 63 malades atteints de rhumatismes inflammatoires chroniques.

42 cas de P. C. E. (dont 23 avec une réaction d'agglutination très positive, 11 cas de spondylarthrite ankylosante, 3 cas de goutte et 7 cas d'arthrose).

Nous avons étudié :

1° Le sérum total provenant de ces 63 malades ;

2° Les euglobulines « brutes » (de façon à ne produire qu'un minimum de dénaturation) obtenues par une technique préconisée par Ziff : dialyse avec agitation mécanique pendant seize heures à  $+4^\circ$  contre un tampon phosphate pH 5,8, de conductivité 1 200 ohms, à partir d'un mélange de sérums positifs à la réaction d'agglutination ;

3° Les protéines éluées, à partir des culots de globules rouges humains sensibilisés et ayant fixé le facteur activateur ou à partir de globuline  $\gamma$  humaine (F II), puis précipitées sous forme d'euglobulines et concentrées.

#### RÉACTIFS.

Nous avons utilisé :

1° L'immunsérum  $\alpha'$  d'équidé anti-sérum humain normal, lots n°s 491 et 1299 de l'Institut Pasteur, préparé sous la direction de M. Grabar.

2° Deux immunsérums de lapin préparé par six injections hebdomadaires, intraveineuses puis intrapéritonéales, de 1,5 et 2 ml de sérum de P. C. E. titrant plus de 1/1 000 en hémagglutination.

3° Deux immunsérums de lapin obtenus par injection des protéines « spécifiques de la P. C. E. » adsorbées sur des culots de globules rouges humains sensibilisés par un immunsérum de lapin, lavés quatre fois avec de l'eau physiologique à  $20^\circ$ .

Nous avons pratiqué dix injections intraveineuses et deux injections sous-cutanées avec adjuvant de Freund, correspondant chacune à la totalité du facteur contenu dans 2 ml de sérum d'un titre élevé.

#### MÉTHODE.

La macrométhode originale de Grabar et Williams a été utilisée dans cette étude ; la coloration des traits de précipitation réalisée à l'aide d'azo-carmin selon Uriel et Grabar. Les quantités employées ont été de 0,05 ml à 0,10 ml pour le sérum ou les fractions euglobuliniques de 0,8 à 1 ml pour les divers anti-sérums.

Nous avons diminué la concentration de gélose à 0,95-1 p. 100 et remplacé le papier des ponts de jonction par une bande de gaze imbibée de tampon et de gélose à 1 p. 100. Ce montage permet une séparation étalée sur 14 cm en trois heures trente minutes sous 110 volts aux bornes.

#### RÉSULTATS.

A. Avec le sérum de mulet anti-sérum humain normal, il n'a pas été possible de mettre en évidence d'arc satisfaisant aux conditions suivantes : 1° présence conditionnée par la positivité de la réaction de Heller-Svartz ; 2° situation correspondant à la localisation du facteur activateur dans le gel, établie antérieurement avec M. Grabar et M<sup>lle</sup> Courcon, à l'aide de globules rouges de mouton sensibilisés et retrouvée par nous avec le système de globules rouges humains, par élution d'étroites bandes coupées dans la gélose ; elle correspond à la cuve de départ et aux premiers centimètres du côté  $\gamma$  zone  $\beta_1$ .

Nous n'avons pas pu localiser le facteur responsable de l'agglutination des hématies tannées ayant fixé une globuline  $\gamma$  pure, l'éluat de la gélose employée s'étant révélé capable à lui seul de provoquer une fine agglutination jusqu'à une dilution élevée.

L'immunsérum de mulet anti-sérum humain normal nous a permis de mettre en évidence dans chacun de ces 63 échantillons de sérum, 25 arcs de précipitation spécifique, dont l'analyse semi-quantitative nous a fait conclure à une discrète augmentation de la macro-globuline normale ( $\beta_2$  M), associée à la positivité de la réaction de Heller-Svartz, bien que ne la conditionnant pas ; car nous avons retrouvé une augmentation bien plus considérable dans des affections différentes ou d'origine indéterminée avec réaction de Heller-Svartz négative (exemple : sérum de Noirs avec cryoglobuline ou macroglobulinémie de Waldenström).

L'augmentation de la fraction  $\beta_2$  M se retrouve dans 20 des 42 cas de P. C. E. (notamment chez 11 des malades ayant un facteur agglutinant d'un titre supérieur à 1/128, et chez 5 des 10 malades ayant un titre de 1/16 à 1/32). Quatre malades ayant

une réaction d'agglutination négative possèdent une augmentation de la  $\beta_2$  M : un cas de P. C. E. de l'enfant, un cas de P. C. E. chez un cirrhotique et deux adultes (tableau I).

TABEAU I. — Corrélation entre l'augmentation de la  $\beta_2$  M et le titre du facteur agglutinant.

Titre du facteur agglutinant	Nombre de cas	Augmentation de la $\beta_2$ M	Proportion de cas positifs
10 24	5	3	11/13
5 12	4	4	
2 56	4	4	
1 28	6	2	5/10
64	4	3	
32 16	3	1	1/3
négatif	16	4	4/6

Un seul malade atteint de spondylarthrite ankylosante présente une discrète augmentation de la  $\beta_2$  M coïncidant avec une réaction d'agglutination légèrement positive (1/32).

L'étude, sur ce petit nombre de malades, des relations entre l'augmentation de la  $\beta_2$  M et la présence du facteur Gm<sup>a</sup> nous a montré que les sujets qui présentent une augmentation de cette globuline sont en grande majorité Gm (a+).

Nous avons également noté l'absence de diminution de l'albumine, contrastant avec une légère augmentation des globulines.

Plus digne de retenir l'attention semble être la constatation d'une  $\beta_1$  A normale, à la différence de ce qui a été vu par Seligmann dans le lupus érythémateux disséminé. L'absence d'arc caractéristique (dont la recherche est pour nous légitime, même avec un immunosérum anti-sérum humain normal) ne pouvait être attribuée à un défaut quantitatif d'antigène, si on se base sur les estimations de Kunkel, concernant la teneur des sérums de P. C. E. en composant 22 S et la quantité de protéine nécessaire à la formation d'un arc de précipitation.

On peut, à l'inverse, supposer qu'on met en évidence dans le sérum de P. C. E. des constituants qui n'existent qu'à une faible concentration dans le sérum normal.

Cependant, la nature « euglobulinique » du facteur activateur nous a permis d'obtenir aisément une concentration vingt fois supérieure à celle du sérum total ; le résultat est resté négatif.



Nous avons, cependant, noté une  $\alpha_2$  et une  $\beta_1$ - $\beta_2$  supplémentaires dans les euglobulines pathologiques n'existant pas dans les euglobulines normales concentrées de la même façon.

B. Avec les immunsérums spécifiques, les immunsérums de lapin anti-sérum de P. C. E. permettent, après concentration, de reconnaître 20 espèces protéiques différentes communes au sérum pathologique et normal (ces anti-sérums sont totalement épuisés par un sérum normal; la teneur en protéine anti-C du sérum employé comme antigène n'a pas été mesurée). Ce résultat pouvant être attribué au fait que le lapin immunisé à l'aide du sérum total n'avait pas été stimulé vis-à-vis du facteur spécifique, il était nécessaire de limiter le nombre d'antigènes injectés et, pour cela, nous avons employé des culots de globules rouges humains sensibilisés, agglutinés par le facteur activateur (ce qui correspond à sa définition même, mais ne prétend pas limiter au facteur le nombre des espèces protéiques « spécifiquement » adsorbées).

Les deux anti-sérums reconnaissent, dans le sérum normal comme dans le sérum de P. C. E. ou leurs euglobulines : l'un la  $\gamma$  et la  $\beta_2$  M, l'autre la  $\beta_2$  M seule.

A la différence des immunsérums de lapin anti-P. C. E., l'immunsérum 491 anti-sérum humain épuisé par du sérum de nouveau-né permet de mettre en évidence dans le sérum de P. C. E. à titre élevé une  $\beta$ -euglobuline (Pernis [9]) que nous avons identifiée à la protéine anti-C (C-reactive protein).

#### DISCUSSION.

Au total, l'utilisation de ces divers anti-sérums, y compris les anti-sérums, en principe spécifiques, n'a pas permis de mettre en évidence un arc de précipitation correspondant à la localisation du facteur activateur.

Il était donc important, devant ces observations, d'évaluer leur pouvoir neutralisant, susceptible de se révéler plus sensible que la diffusion en gélose ou en gélatine (que nous avons employée dans l'hypothèse d'une intervention du support gélosé). Les systèmes de globules rouges sensibilisés ne nous ont pas permis d'observer de propriétés inhibitrices du fait de l'interférence de divers phénomènes sérologiques (dans certaines conditions, nous avons même observé un renforcement du facteur activateur). Les suspensions de particules de latex (bien que décelant un facteur légèrement différent), revêtues d'une globuline purifiée, devaient permettre l'évaluation de cette inhibition, mais le sérum de lapin neuf, par ses globulines, se révèle également inhibiteur.

Une explication physico-chimique de l'absence de trait de précipitation peut être envisagée d'après les constatations suivantes :

1° La faible migration du facteur à partir de la cuve de départ, même si l'électrophorèse est prolongée d'une façon importante. Cette faible migration est observée aussi en électrophorèse sur papier et sur amidon.

2° La persistance dans cette cuve, après lavage, du résidu protéique confirmé par la coloration et d'autant plus important que la  $\beta_2$  M est augmentée.

3° La formation d'un anneau de précipité particulièrement net et difficilement soluble dans l'eau physiologique autour de la cuve contenant les globulines de P. C. E. examinées, en boîte d'Ouchterlony, avec de la gélose type immuno-électrophorèse.

4° Le faible rendement après découpage et élution des bandes de gélose.

La solubilité de ce type de protéines, en fonction des conditions physico-chimiques, permettait de penser que des variations « locales » pouvant survenir au cours de l'électrophorèse en gel, il était nécessaire de répéter l'analyse immuno-électrophorétique dans des conditions à la fois différentes et plus rigoureuses : force ionique plus élevée, pH 8,6, gélose plus lâche et hautement polymérisée, d'une part, soustraction totale du calcium, d'autre part, en modifiant le schéma devenu classique de l'immuno-électrophorèse une migration significative du facteur hors du réservoir de départ.

Ces premiers résultats ont conduit à préparer un éluat homogène à l'immuno-électrophorèse, non pas en se servant des globules rouges sensibilisés, mais de la globuline  $\gamma$ . Cet éluat possède l'activité sérologique du sérum original ; il est constitué de globulines  $\gamma$ ,  $\beta_2$  M et d'une trace de  $\beta_2$  A, provenant du sérum de P. C. E.

#### RÉSUMÉ.

L'étude immuno-électrophorétique de 63 cas de rhumatismes inflammatoires chroniques a été effectuée à l'aide de différents immunsérums.

L'immunsérum anti-sérum humain normal a permis d'observer dans le sérum des malades 25 arcs de précipitation dont 1 n'existe pas dans le sérum normal. Les immunsérums de lapin anti-sérum de P. C. E. ont individualisé 20 arcs dans le sérum de P. C. E., comme dans le sérum normal. Tandis que l'immunsérum, obtenu par injection au lapin de culots globulaires ayant fixé le facteur activateur, permet d'identifier dans l'éluat, à partir de la globuline  $\gamma$ , les globulines  $\gamma$ ,  $\beta_2$  M et une trace de  $\beta_2$  A. Les résultats obtenus font envisager une relation entre le facteur activateur et le couple des globulines  $\beta_2$  M et  $\gamma$ .

## SUMMARY

IMMUNO-ELECTROPHORETIC STUDY  
OF CHRONIC INFLAMMATORY RHEUMATISMS.

Immuno-electrophoretic study of 63 sera from patients suffering from chronic inflammatory rheumatism by means of various immune sera.

An immune serum anti-normal human serum demonstrates in the patients sera 25 lines of precipitation, 1 of which does not exist in normal sera.

An anti-rheumatoid arthritis immune serum prepared in rabbits demonstrates 20 lines of precipitation in rheumatoid as well as in normal sera.

With an immune serum obtained by injection into rabbits of erythrocytes sediment having adsorbed the activating factor, it is possible to identify in the eluate, obtained from rheumatoid serum and  $\gamma$  globulin,  $\beta_2$  M,  $\gamma$  and small amount of  $\beta_2$  A globulins. The findings suggest the existence of a relationship between the activating factor and the  $\beta_2$  M and  $\gamma$  globulins.

★ ★

Cette étude a été effectuée avec la collaboration de M. Amoyel. Nous remercions M. Grabar d'avoir bien voulu nous guider au cours de cette étude.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURTIN (P.), HARTMANN (L.), HEREMANS (J.), SCHEIDEGGER (J. J.), WESTENDORP-BOERMA (F.), WIENE (R.), WUNDERLY (CH.), FAUVERT (R.) et GRABAR (P.). *Rev. Franç. Etud. Clin. Biol.*, 1957, **41**, 161.
- [2] CLEVE (H.) et HARTMANN (E.). *Klin. Wsch.*, 1957, **35**, 334.
- [3] EYQUEM (A.), PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.). *VI<sup>e</sup> Congrès Soc. Europ. Hématol.*, Copenhague, Karger, édit.
- [4] EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). *Entretiens de Bichat*, 1958.
- [5] FRANKLIN (F. C.), HOLMAN (H. R.), MULLER-EBERHARD (H. J.) et KUNKEL (H. G.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 425.
- [6] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
- [7] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1955, **17**, 67.
- [8] JACQUELINE (F.), EYQUEM (A.) et PODLIACHOUK (L.). *Rev. Rhum.*, 1957, **24**, 385.

- [9] PERNIS (B.), GHISLANDI (E.) et GHEZZI (I.). *Atti Soc. Lombard. Sci. med. Brd.*, 1957, **12**, 170.
- [10] PODLIACHOUK (L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 659.
- [11] SELIGMANN (M.) et HANAU (C.). *Rev. hématol.*, 1958, n° 2, 239.
- [12] SHEIFFARTH et GOTZ. (*Sous presse.*)
- [13] ZIFF (H.), BROWN (P.), BADIN (J.) et MC EVEN (C.). *Bull. Rheuma. Dis.*, 1954, **5**, 75.



## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE *GEOTRICHUM* ET *TRICHOSPORUM* D'ORIGINE HUMAINE

par M. VIEU et G. SEGRETAIN (\*).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie et de Physiologie végétale)

Dans les prélèvements pathologiques couramment examinés dans le Service de Mycologie de l'Institut Pasteur, on isole fréquemment, à côté de *Candida*, de dermatophytes et d'*Aspergillus*, des champignons arthrospores appartenant aux genres *Geotrichum* et *Trichosporon*. Les premiers sont des champignons filamenteux se multipliant uniquement par arthrospores produites par la désarticulation des filaments, alors que les *Trichosporon* sont classés parmi les levures, développant à la fois un pseudomycélium portant des blastopores et un mycélium vrai se désarticulant en arthrospores ; ces derniers peuvent donc à la fois se multiplier par arthrospores et blastopores.

De septembre 1957 à mai 1958, 28 souches de champignons arthrospores ont été isolées de divers prélèvements pathologiques humains. Pour différencier parmi ces souches les *Geotrichum* des *Trichosporon*, nous avons étudié l'ensemble de leurs caractères morphologiques et biochimiques ; nous les avons comparés à ceux de 14 souches d'origine humaine provenant de diverses collections (1), et nous avons envisagé leur répartition suivant leur origine clinique.

### EXPÉRIMENTATION.

ISOLEMENT. — Les produits pathologiques (crachats, selles, squames et débris d'ongles) sont ensemencés sur gélose de Sabouraud glucosée à 2 p. 100 et sur gélose au moût de bière en présence de 20 U. O./cm<sup>3</sup> de pénicilline et 40 µg/cm<sup>3</sup> de streptomycine, ajoutés extemporanément [6]. Dans de nombreux cas il est indispensable de faire un étalement en boîte de Petri, pour pouvoir isoler en toute certitude une colonie bien individualisée, car il est très fréquent de trouver ces champignons en association avec des dermatophytes ou des levures. Les *Geotrichum* se développant en culture plus vite que les *Candida*,

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1958.

(1) Nous remercions le Centraalbureau voor Schimmelcultures, le Laboratoire italien de Cryptogamie de Pavie et l'Institut d'Hygiène de Montevideo de nous avoir envoyé ces souches.

l'examen direct de tels prélèvements montre la présence d'arthrospores et de levures bourgeonnantes, ce que l'on voit également à l'examen direct d'une culture de *Trichosporon*.

ETUDE DE LA MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE. — 1° *Milieu solide*. — Les souches isolées sont repiquées sur gélose de Sabouraud glucosée et sur moût de bière gélosé, à 25°, 30° et 37°, ainsi que sur milieu pomme de terre glucosé à 25°, préconisé par Lodder et Kreger van Rij [41]. Le milieu de Sabouraud-actidione [8], milieu de routine pour l'isolement des dermatophytes, a été également utilisé.

2° *Milieu liquide* : La formation de voile, d'anneau ou de dépôt est observée en moût de bière liquide (tubes de 17 mm) après sept, quinze et trente jours de culture à 25°.

ETUDE DE LA MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE. — La culture sur lame des champignons permet d'étudier leur morphologie microscopique ; la technique employée est celle de Rivalier et Seydel [16] ; nous n'avons pas recouvert partiellement la lame gélosée d'une lamelle [4]. Les milieux employés sont le moût de bière gélosé et la gélose pomme de terre glucosée, en ayant soin d'utiliser des milieux à faible concentration en gélose (8 à 10 p. 1 000 de gélose au lieu de 18 à 20 p. 1 000).

ETUDE PHYSIOLOGIQUE. — 1° *Fermentation des sucres*. — La technique utilisée est celle mise au point pour la détermination des *Candida* [6] (eau peptonée à 1 p. 100, ajustée à pH 7,4-7,2 et additionnée d'indicateur d'Andrade qui vire du jaune paille au rouge cerise plus ou moins intense suivant l'acidification ; ce milieu est réparti à raison de 9 cm<sup>3</sup> en tubes d'Ivan Hall, et après stérilisation on ajoute 1 cm<sup>3</sup> d'une solution stérile de sucre à 20 p. 100). Le glucose n'ayant pas donné de fermentation gazeuse (seulement une acidification de la partie supérieure des tubes plus riche en oxygène) les autres sucres n'ont pas été étudiés ; en effet, suivant Kluyver et Stelling-Dekker [9], « toute levure qui ne fait pas fermenter le glucose, ne fait fermenter aucun sucre ».

2° *Assimilation des sucres et de l'azote*. — Nous nous reporterons encore une fois à la description qui en a été donnée dans l'étude sur la détermination des *Candida* [6] : même milieu de base (2) enrichi en biotine 10<sup>-9</sup>, thiamine 10<sup>-6</sup>, acide nicotinique 10<sup>-6</sup> et pyridoxine 10<sup>-6</sup>, et ensemencé avec une émulsion de spores non lavées ; les sucres d'épreuve sont le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose et le raffinose. Pour l'assimilation des matières azotées, le nitrate de potassium est le seul à présenter des différences d'utilisation et le sulfate d'ammonium, toujours utilisé, n'est employé ici que comme témoin. Aucune des souches étudiées n'utilise le nitrate de potassium.

3° *Dédoublément de l'arbutine*. — Lodder et Kreger van Rij [41] ont trouvé cette réaction chez certaines levures et incluent cette épreuve

(2) La source d'azote est du sulfate d'ammonium. L'importance de cette source pour l'assimilation des sucres a été bien montrée par Windisch.

dans le protocole de détermination d'une levure quelconque ; par hydrolyse, l'arbutine donne du glucose et un aglucone, l'hydroquinone, qui fait virer au brun le milieu en présence d'impuretés ferriques. Nous utilisons une gélose à l'extrait de levure à 0,5 p. 100 d'arbutine où la coloration peut apparaître à 26°, deux à six jours après l'ensemencement.

4° *Recherche du pouvoir protéolytique.* — Suivant les méthodes bactériologiques usuelles, nous avons suivi le développement des souches étudiées sur sérum coagulé et gélatine en culot à 25° pendant deux à cinq semaines ; la culture sur lait tournesolé à 25° a été également pratiquée pour toutes les souches.

5° *Formation d'amidon.* — Elle a été constatée par Aschner et coll. [4] pour les levures capsulées ; pour les champignons du genre *Trichosporon* [2], elle est suffisamment caractéristique d'espèce et même de genre pour avoir un intérêt taxonomique. Le milieu est le suivant : glucose : 1 p. 100 ;  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  : 1 p. 100 ;  $\text{PO}_4\text{K H}_2$  : 0,1 p. 100 ;  $\text{MgSO}_4$  : 0,5 p. 100 ; thiamine :  $10^{-6}$  ; biotine :  $10^{-9}$  ; gélose lavée : 1,5 p. 100 ; le pH final doit être acide, aux environs de 5. La lecture se fait après trois semaines en faisant couler quelques gouttes de solution iodée (lugol) à la surface des cultures.

## RÉSULTATS.

Les tableaux I et II résument l'ensemble des résultats obtenus pour les souches arthrosporées récemment isolées dans le Service de Mycologie (28 souches sur 420 prélèvements examinés), le tableau III ceux des souches de collection.

En cultivant sur gélose au moût de bière à 25°, on peut aisément distinguer les colonies membraneuses et épaisses des *Trichosporon* des colonies plates et filamenteuses des *Geotrichum* ; et pour chacun de ces deux genres, nous différencions encore deux formes : pour les *Trichosporon*, dont les colonies membraneuses cérébriformes à vermiculées sont incolores ou de couleur crème, le type T1 a une surface glabre et le type T2, moins cérébriforme, une surface brillante et humide ; ce dernier aspect est celui que présentent la plupart des champignons à leur isolement ; au cours des repiquages ils évoluent vers le type T1 que présentent les souches de collection. Deux types figurent dans les *Geotrichum* : le type G1, le plus fréquemment rencontré à colonies blanches et poudreuses ; le type G2, caractérisé par des colonies incolores ou couleur crème, à surface glabre. Entre ces deux formes on trouve des aspects de transition.

Les revers des colonies sont un peu mamelonnés chez les *Trichosporon*, plans chez les *Geotrichum*, mais aucun ne présente de pigmentation.

La nature du milieu de culture (moût de bière, Sabouraud

TABLEAU I. - *Geotrichum* d'isolement récent.

N° sou- ches	Origine du prélèvement	Champignons associés	Auxanogramme des sucres				Test arbu- tine	Cult. à 37°	Morphologie		Activité protéolytique
			Gl.	Ga.	Sa.	Ma.	La.	Ra.	Macro	Micro	
1560	rectum	<i>C. albicans</i>	++	++	-	-	-	-	G.2	arthro.	-
1583	langue noire		++	++	-	-	-	++	G.2	"	-
1612	bronchoscopie		+	++	-	-	-	++	G.2	"	-
1652	langue	<i>C. albicans</i>	+	++	-	-	-	-	G.2	"	±
1667	expectoration	<i>C. tropicalis</i>	+	++	-	-	-	+	G.2	"	-
1670	amygdale	<i>C. krusei</i>	+	++	-	-	-	±	G.2	"	-
Des selles			+	+	-	-	-	+	G.2	"	-
1753	gorge		++	++	-	-	-	+	G.2	"	±
1767	expectoration		++	+	-	-	-	-	G.2	"	-
1768	expectoration	<i>C. pseudo- tropicalis</i>	+	+	-	-	-	-	G.1	"	-
1830	selles		+	+	-	-	-	+	G.1	"	-
1845	anus		++	++	-	-	-	++	G.2	"	±
1882	langue		++	++	-	-	-	++	G.2	"	++
1897	anus		++	++	-	-	-	++	G.2	"	++
1946	selles		++	++	-	-	-	++	G.1	"	-
			++	++	-	-	-	++	G.1	"	++

++, Résultats rapides et très nets en ce qui concerne l'assimilation des sucres, la croissance à 37°, le noircissement de l'arbutine, la liquéfaction de la gélatine et du sérum coagulé. Dans le cas du lait tournesolé : acidification, coagulation puis peptonisation. ±, Résultats nets mais moins intenses ; acidification et coagulation du lait tournesolé sans peptonisation secondaire. Présence de blastospores ou d'arthrospores.

+, Résultats très faibles ou très lents ; lait tournesolé, acidification seule.

—, Croissance ou activité biochimique nulle. Absence de blastospores ou d'arthrospores.

Gl., Glucose ; Ga., galactose ; Sa., saccharose ; Ma., maltose ; La., lactose ; Ra., raffinose.

G. 1, Morphologie macroscopique type *Geotrichum asteroides*.

G. 2, Morphologie macroscopique type *Geotrichum candidum*.

T. 1, Morphologie macroscopique type *Trichosporon* à surface glabre.

T. 2, Morphologie macroscopique type *Trichosporon* à surface humide.

Ar ou arth., arthrospores ; blas., blast., blastospores ; non ou non différenc., non différenciés.



TABLEAU II. — *Trichosporon* d'isolement récent.

N° sou- ches	Origine du prélèvement	Champignons associés	Auxanogramme des sucres						Test arbu- tine	Cult. à 37°	Morphologie		Activité protéolytique	
			Gl.	Ga.	Sa.	Ma.	Le.	Ra.			Macro	Micro	Gélatine	Lait Sérum
1540	ongle		++	+	+	+	+	±	±	++	T.1	ar. bl	++	±
1544	ongle		++	++	++	+	+	-	±	++	T.2	+	++	+
1566	ongle		++	+	++	+	+	+	+	++	T.2	+	+	±
1688	esp. interd.	<i>T. rubrum</i>	++	++	++	++	++	+	+	++	T.1	+	-	++
1742	esp. interd.	<i>T. rubrum</i>	+	+	+	+	+	+	+	++	T.2	+	++	++
1759	esp. interd.		+	++	++	++	++	-	+	++	T.1	+	++	±
1779	esp. interd.	<i>E. floccosum</i>	++	++	++	++	++	-	+	++	T.2	+	++	±
1814	esp. interd.		++	++	++	++	++	-	+	++	T.1	+	±	+
1831	esp. interd.		++	++	++	++	++	-	+	++	T.1	+	++	-
1943	pied		++	++	++	++	++	+	++	++	T.1	+	++	+
1958	thorax		++	++	++	++	++	+	++	+	T.2	+	++	±
1960	anus		++	++	++	++	++	-	++	++	T.1	+	++	++
1962	face		++	±	±	+	+	-	++	++	T.1	+	++	++

Voir légende du tableau I.

TABLEAU III. — *Geotrichum* et *Trichosporon* de collections.

Souches	Collections	Auxanogramme des sucres						test arbu- tine 37°	Cult. à 37°	Morphologie		Activité protéolytique	
		Gl.	Ga.	Sa.	Ma.	La.	Ra.			Macro	Micro	Gélatine	Lait Sérum
<i>T. cutaneum</i>	C.B.S.	+	+	+	+	+	-	++	±	T.1	moniliforme	-	-
<i>T. cutaneum</i>	L.C.P.	++	++	+	++	+	-	++	-	T.1	arthrosp.	-	-
<i>T. asteroides</i>	L.C.P.	++	++	+	++	+	-	±	-	T.1	mon., arthr.	-	-
<i>T. capitatum</i>	C.B.S.	++	++	±	-	-	-	++	++	T.1	moniliforme	-	-
<i>T. capitatum</i>	L.C.P.	++	++	+	+	-	-	±	++	T.1	arthrosp.	-	±
<i>G. candidum</i>	C.B.S.	++	++	-	-	-	-	-	-	G.2	arthrosp.	-	-
<i>G. versiforme</i>	C.B.S.	++	++	-	-	-	-	-	±	G.1	arthrosp.	-	-
<i>G. asteroides</i>	C.B.S.	++	++	±	-	-	-	-	-	G.1	arthrosp.	-	-
<i>G. asteroides</i>	I.H.M.	++	++	±	±	-	-	-	-	G.1	arthrosp.	-	-
<i>G. pulmonum</i>	L.C.P.	++	++	±	-	-	-	+	-	G.1	arthrosp.	-	-
<i>G. candidum</i>	I.H.M.	++	++	+	+	+	-	++	±	G.1	arth., blast.	-	-
<i>G. matalense</i>	I.H.M.	++	++	+	±	±	-	-	-	G.1	arthrosp.	-	-
<i>G. rotundatum</i>	I.H.M.	++	++	±	±	++	-	++	-	T.1	arthrosp.	-	-
<i>G. rugosum</i>	I.H.M.	++	++	±	±	++	-	++	-	T.1	filaments	-	-

C. B. S. : Centraalbureau voor Schimmelmecultures, Baarn. — I. H. M. : Institut d'Hygiène de Montevideo. — L. C. P. : Laboratoire italien de Cryptogamie, Pavie. — Voir légende du tableau I.

glucosé ou maltosé) n'a pas modifié sensiblement la morphologie macroscopique ; seul le milieu gélose-pomme de terre glucosé favorise l'aspect filamenteux blanc poudreux des cultures de *Geotrichum*. Toutes les souches se développent de même sur gélose Sabouraud-actidione, qui inhibe ou retarde la croissance de certains champignons saprophytes ; leur morphologie macroscopique n'a pas été modifiée.

Toutes les souches ne se développent pas également à 37° : les souches d'isolement récent croissent mieux que les souches de collection, et les *Trichosporon* mieux que les *Geotrichum*, mais il est possible, par repiquages successifs, d'habituer les souches à se développer à 37°. Les aspects des cultures sont les mêmes à 37° et 27° ; la température ne semble apporter ici aucune modification morphologique.

Si, aux tubes bouchés au coton, on substitue des tubes à vis fermés par un capuchon d'aluminium, les *Geotrichum* perdent leur aspect blanc poudreux pour donner des colonies glabres, incolores et finement rayonnées.

Toutes les souches étudiées forment un voile, aussi ce caractère n'est-il pas noté sur les tableaux. Ce voile, floconneux et fragile, tombe facilement chez les *Trichosporon* ; celui des *Geotrichum* est plus solide, glabre, incolore à grisâtre.

En culture sur lame, le milieu pomme de terre glucosé permet de voir, chez les souches d'isolement récent, à côté des arthrospores (pl., fig. 2 b) la présence de blastospores bourgeonnantes, spécifiques des *Trichosporon*, et leur absence totale dans les cultures de *Geotrichum*. Cette formation de blastospores, située sur les filaments périphériques (pl., fig. 2 a), n'a pas été mise en évidence chez les souches de collection de *Trichosporon* où l'on trouve seulement, à côté des arthrospores, des filaments monili-formes (pl., fig. 3) ; quelques auteurs pensent que, dans les cultures de *Trichosporon*, la formation de blastospores disparaît assez vite après leur isolement au profit des seules arthrospores (3) ; on aura donc intérêt à réaliser les cultures sur lames dès l'isolement des souches.

Au cours de l'étude des caractères physiologiques, l'auxanogramme du carbone s'est révélé d'un grand intérêt ; en effet, il

(3) Le repiquage à 37° sur gélose au sang et sur milieu de Kurung (milieux couramment utilisés pour l'obtention de la phase levure des champignons des mycoses profondes) de quelques souches de collection et d'autres d'isolement récent, nous ont permis de constater pour ces dernières seulement, identifiées à *T. cutaneum*, un net accroissement, dès le premier repiquage, des formes levures aux dépens de la phase filamenteuse ; une souche identifiée à *G. asteroides* n'a donné que des arthrospores quadrangulaires.

existe, chez les souches d'isolement récent, deux types bien différents d'utilisation des sucres : les *Geotrichum* utilisent le glucose et le galactose (fig. 1), les *Trichosporon* le glucose, le galactose, le saccharose, le maltose, le lactose et quelquefois le raffinose (fig. 1) ; ce caractère est inconstant pour les souches de collection ; nous préciserons à ce propos que celles-ci ont été mentionnées sous les noms d'espèces et de genre sous lesquels elles nous ont été envoyées et que l'on peut envisager que le vieillissement entraîne une modification de ces caractères physiologiques [48].

Le test à l'arbutine est positif pour toutes les souches d'isolement récent de *Trichosporon* et négatif pour celles de *Geotrichum*, à l'exception d'une seule ; nous retrouverons ce caractère chez les souches de collection, mais de façon moins constante.

Les souches de collection ne montrent aucune activité protéolytique et, parmi les souches d'isolement récent, on note une faible activité chez les *Geotrichum*, et une activité plus grande chez les *Trichosporon* : liquéfaction lente (après cinq semaines), mais presque constante de la gélatine, acidification du lait avec coagulation et digestion du caillot dans quelques cas ; l'action sur le sérum n'a été positive que pour de rares souches.

L'étude de la formation d'amidon nous a été peu utile pour l'identification de nos souches : seules quelques souches de collection *T. culaneum* souche CBS, *G. rotundatum* et *G. rugosum* ont donné faiblement cette réaction ; nous avons utilisé comme témoin une souche de *Cryptococcus neoformans* IP33, qui a donné la même réaction que les 3 souches précédentes.

#### DISCUSSION.

L'ensemble de cette étude met en évidence une discrimination très nette entre les genres *Trichosporon* et *Geotrichum*, fondée sur la morphologie microscopique : les *Trichosporon* se reproduisent par arthrospores et blastospores, les *Geotrichum* par les seules arthrospores ; les caractères physiologiques confirment cette distinction : les *Trichosporon* d'isolement récent assimilent presque tous les sucres employés (glucose, galactose, saccharose,

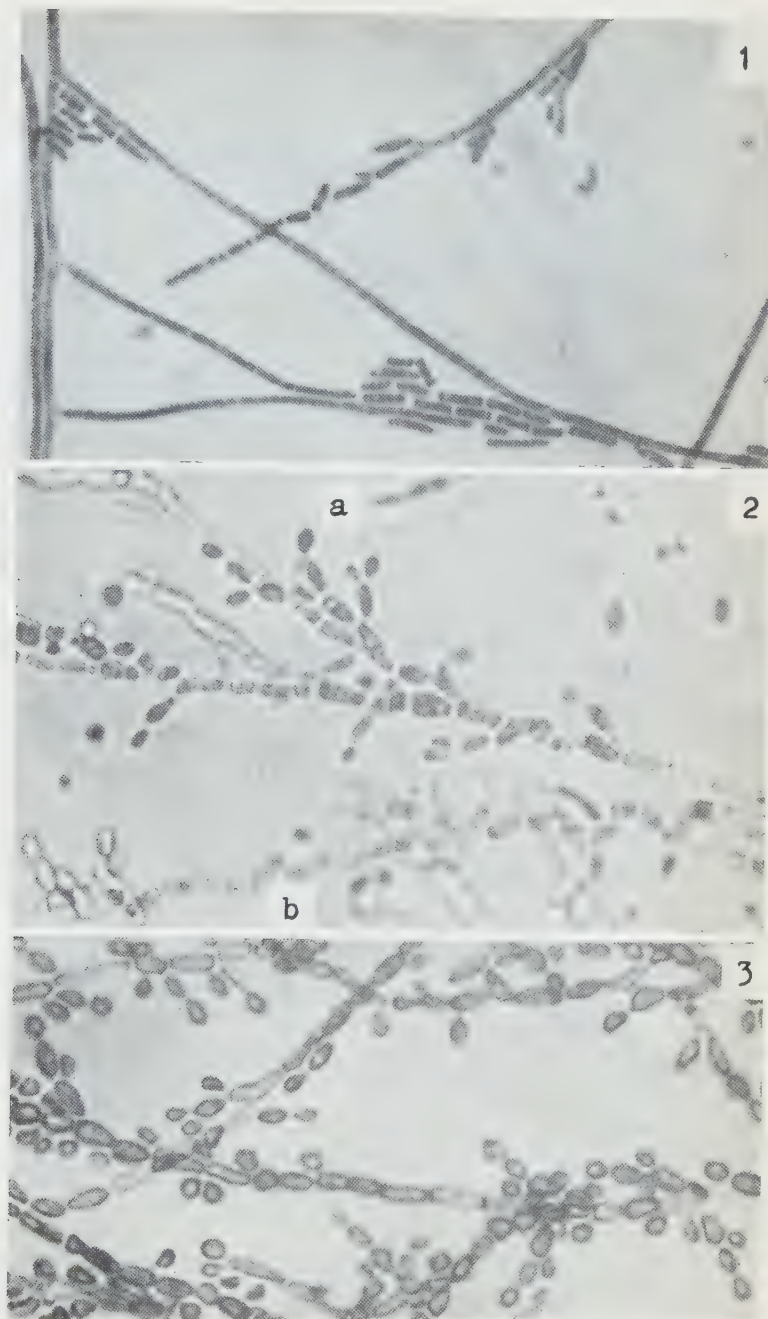
#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Filaments de *Geotrichum* se désarticulant en arthrospores.

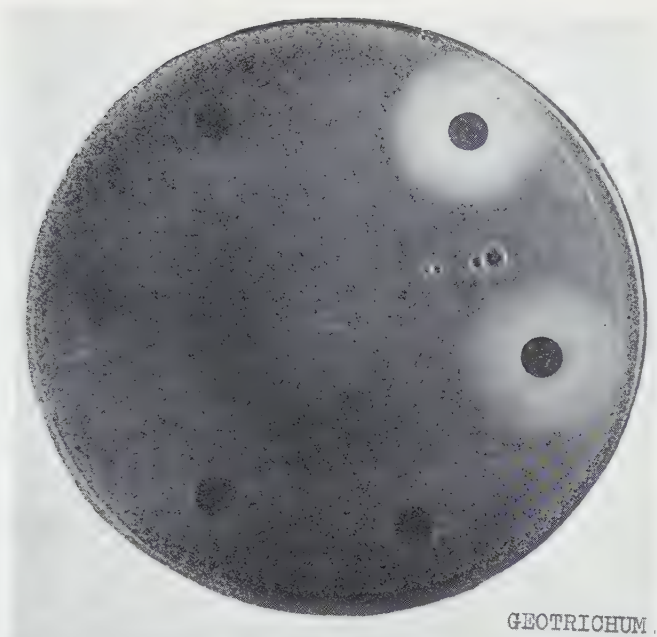
FIG. 2. — Filaments d'une culture de *Trichosporon* récemment isolée : a) blastospores bourgeonnantes ; b) filaments se désarticulant en arthrospores.

FIG. 3. — Filaments moniliformes d'une culture de collection de *Trichosporon*.









GEOTRICHUM.



TRICHOSPORUM

FIG. 1. — Auxanogrammes des sucres. A gauche, de haut en bas : raffinose, lactose, maltose. A droite, de haut en bas : glucose, galactose, saccharose.

maltose, lactose et quelquefois raffinose), dédoublent l'arbutine, se développent bien à 37°, liquéfient la gélatine et attaquent le lait tournesolé ; il en est de même des souches de collection ; seules les deux souches de *T. capitatum* en diffèrent, n'assimilant que le glucose, le galactose et le saccharose ; d'ailleurs, l'origine clinique de ces dernières est différentes : *T. capitatum* aurait été isolé de prélèvements pulmonaires, *T. cutaneum*, comme son nom l'indique, de la peau ; c'est le cas de toutes les souches d'analyse que nous avons déterminées comme *Trichosporon*, et nous les identifions donc à *T. cutaneum*. En accord avec Lodder et Kreger van Rij, les caractères de *T. asteroides* permettent de l'identifier à *T. cutaneum*.

Les *Geotrichum* récemment isolés présentent aussi les mêmes caractères physiologiques : ils n'assimilent que le glucose et le galactose, ne dédoublent pas l'arbutine, n'ont pas de pouvoir protéolytique et semblent appartenir tous au même groupe ; pour les souches de collection, les caractères physiologiques ne présentent que des différences peu sensibles. Les types macroscopiques des cultures pourraient peut-être permettre de distinguer deux espèces : *G. asteroides* à culture blanche, poudreuse, et *G. candidum* à culture glabre, et de rattacher à la première l'ensemble des souches d'analyse déterminées comme *Geotrichum*. Mais bien que ces souches d'analyse ne soient conservées que depuis quelques mois, nous avons déjà constaté pour les plus anciennes une évolution de l'aspect « *asteroides* » (type G1) vers l'aspect « *candidum* » (type G2) ; leur origine clinique ne permet pas non plus de différenciations : dans tous les cas il s'agit de prélèvements à partir de muqueuses (langue, amygdale, selles), ou de prélèvements pulmonaires (expectorations, bronchoscopies), mais jamais de prélèvements cutanés comme c'était le cas pour toutes les souches identifiées à *T. cutaneum* ; leurs auxanogrammes sont du type *G. candidum*, aussi les identifions-nous comme tels. Quant aux souches de *Geotrichum* de collection, *G. versiforme* présente les mêmes caractères que *G. candidum* ; les deux souches de *G. asteroides* et celle de *G. pulmoneum* nous semblent voisines, malgré une faible utilisation du saccharose et, pour la dernière, le dédoublement de l'arbutine. *G. candidum* IHM présente tous les caractères de *T. cutaneum* ; *G. matalense* en est très proche, ainsi que *G. rotundatum* et *G. rugosum* tous deux déjà considérés par Lodder [41] comme *T. cutaneum*.

*Geotrichum* et *Trichosporon* ont été rencontrés dans de nombreux cas cliniques et décrits sans beaucoup de précision sur leur position systématique. Celle-ci s'est élaborée assez difficilement ainsi qu'en témoigne le nombre de leurs synonymes. En 1938, Puntoni [44] donne une large étude du genre *Trichosporon* Ota, le distinguant



d'un côté des purs arthrosporés, de l'autre des blastosporés. Quelques années après, Redaelli et Ciferri [15] font, à propos de quelques nouvelles souches isolées, une revue des *Trichosporon* en donnant leurs caractères cultureux, micromorphologiques et biochimiques. En 1942, Diddens et Lodder [5], dans une monographie très complète sur les levures anascosporées, proposent d'adopter *Trichosporon* comme nom de genre pour ces champignons, et en 1952, Lodder et Kreger van Rij [41] donnent la description des 8 bonnes espèces qu'elles reconnaissent ; 18 sur 19 souches de *T. cutaneum* sont d'origine humaine. Dans leur important travail sur la classification des champignons levuriformes, Langeron et Talice [10] distinguent des colonies crémeuses et des colonies membraneuses ; parmi ces dernières, les *Geotrichoides* ont un pseudo-mycélium fragile, des arthrospores et des blastosporés (caractères du genre *Trichosporon*) et les *Geotrichum* un mycélium vrai qui se désarticule en arthrospores ; dans ce dernier genre, *G. candidum* est considéré comme l'espèce type. Etudiant la flore mycologique de l'intestin des rongeurs domestiques, Cochet [3] rapproche les deux genres *Geotrichum* et *Trichosporon*, tous deux champignons arthrosporés se distinguant des autres champignons isolés qui sont de purs blastosporés, mais en soulignant que « ces deux genres sont trop imparfaitement connus par les quelques espèces qui en ont été décrites, pour qu'on puisse leur assigner une place définitive dans la systématique des champignons » ; il est probable, pour cet auteur, que de nombreux champignons décrits sous le nom de *Geotrichum*, appartiennent en réalité au genre *Trichosporon*.

Les *Geotrichum*, souvent décrits comme agents pathogènes, sont aussi couramment considérés comme saprophytes ; la richesse et la pureté de leur isolement ainsi que leur persistance au cours d'examen répétés peut faire envisager leur rôle pathogène ; c'est ainsi que dans quelques cas où des *Geotrichum* avaient été isolés de selles en grande abondance à plusieurs reprises, ils avaient été considérés comme l'agent pathogène. Dans plusieurs des cas étudiés ici, ils étaient associés à des *Candida*, et le rôle pathogène de l'un et l'autre germe est alors à discuter.

Le rôle pathogène des *Trichosporon* est encore moins certain : dans 3 cas sur 13, ils étaient associés à des dermatophytes, agents pathogènes responsables des lésions en cause. Nous pensons que ces champignons sont des saprophytes de la peau, mais il est possible que leur abondance et leur fréquence permettent, dans quelques rares cas, d'envisager leur rôle pathogène.

Le pouvoir pathogène de ces deux genres de champignons pour les animaux de laboratoire n'a été qu'abordé par nous : les inoculations intrapéritonéales aux souris de 0,5 cm<sup>3</sup> de suspen-

sions de *Trichosporon capitatum*, *T. cutaneum*, *Geotrichum asteroides*, *G. candidum* et *G. versiforme* (souches CBS) n'ont pas provoqué la mort des animaux et leurs autopsies après quarante-cinq jours n'ont mis en évidence aucune lésion organique ; ce problème n'a pas été souvent envisagé au cours des études sur ces champignons et les rares résultats obtenus sont assez divers [7, 12, 13 et 17].

#### RÉSUMÉ.

De prélèvements pathologiques d'origines très diverses, on a isolé, dans 7 p. 100 des cas, des champignons arthrospores. L'étude de leur morphologie en culture sur lame sur milieu pomme de terre glucosé permet de distinguer les *Geotrichum* se reproduisant uniquement par arthrospores des *Trichosporon* se reproduisant par arthro- et blastospores. Leurs caractères physiologiques confirment cette distinction : 13 *Trichophyton cutaneum* et 15 *Geotrichum candidum* ont été identifiés comparativement à 14 souches de diverses collections. L'évolution pléomorphique de ces souches est envisagée.

#### SUMMARY

##### CONTRIBUTION TO THE STUDY OF *Geotrichum* AND *Trichosporon* OF HUMAN ORIGIN.

From pathological material originating from various sources, arthrospore fungi have been isolated in 7 % of the cases. The study of their morphology on potato medium in slide-cultures allows to differentiate *Geotrichum* (which only form arthrospores) from *Trichosporon* (which form arthrospores and blastospores). The physiological properties confirm the results obtained by the study of their morphology. Thirteen *T. cutaneum* and fifteen *G. candidum* have been identified by comparison with fourteen strains originating from various collections.

The pleomorphic evolution of these strains is discussed.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASCHNER (M.), MAGER (J.) et LEIBOWITZ (I.). *Nature*, 1945, **156**, 295.
- [2] ASCHNER (M.) et CURY (A.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 350.
- [3] COCHET (J.). *Thèse Doctorat ès-sciences, Paris*, 1940.
- [4] DALMAU (L. M.). *Ann. Parasit.*, 1929, **7**, 536.
- [5] DIDDENS (H. A.) et LODDER (J.). *Die anaskosporogenen Hefen. II. Teil.* N. V. Noord-hollandsche Uitgevers Maatschappij, Amsterdam, 1942.
- [6] DROUHET (E.) et COUTEAU (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 602.

- [7] GAUVREAU et GRANDBOIS. *Laval Méd.*, 1954, **19**, 59.
- [8] GEORG (L. K.), AJELLO (L.) et PAPAGEORGE (C.). *J. Lab. clin. Med.*, 1954, **44**, 422.
- [9] KLUYVER (A. J.) et STELLING-DEKKER, in LANGERON. *Précis de Mycologie*, Masson édit., Paris, 1945.
- [10] LANGERON (M.) et TALICE (R. V.). *Ann. Parasit.*, 1932, **10**, 1.
- [11] LODDER (J.) et KREGER van RIJ (N. J. W.). *The Yeasts*, North-Holland Publishing Cie, Amsterdam, 1952.
- [12] MARTINS (C.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **98**, 1162.
- [13] MORQUER (R.), LOMBARD (C.) et BERTHELON (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, **240**, 378.
- [14] PUNTONI (V.). *Mycopath.*, 1958, **1**, 169.
- [15] REDAELLI (P.) et CIFERRI (R.). *Mycopath.*, 1941, **3**, 203.
- [16] RIVALIER (E.) et SEYDEL (S.). *Ann. Parasit.*, 1932, **10**, 442.
- [17] THJOTTA (Th.) et URDAL (K.). *Acta path. microbiol. scand.*, 1949, **673**, 26.
- [18] UDEN (N. van) et CARMO SOUSA (L. do). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, 385.

# LA CLASSIFICATION DES ACTINOMYCÈTES PAR LA MÉTHODE DE LA VARIATION EXPÉRIMENTALE

par N. A. KRASSILNIKOV (\*).

*(Institut de Microbiologie de l'Académie des Sciences,  
Moscou)*

Il serait actuellement extrêmement nécessaire d'introduire dans la science des antibiotiques une rationalisation des recherches et une classification des producteurs de substances antibiotiques. Au cours de ces récentes années, de très nombreuses espèces productrices d'antibiotiques ont été décrites chez les bactéries, les champignons, en particulier chez les Actinomycètes. Mais la plupart des auteurs qui décrivent un microorganisme producteur d'antibiotique ne fournissent pas les renseignements essentiels à la détermination de ce microorganisme et à sa comparaison avec d'autres espèces. Souvent on décrit la culture de ces germes sur des milieux qui ne sont pas typiques pour le développement des caractères de l'espèce. Certains chercheurs donnent les caractéristiques de croissance en milieu synthétique, d'autres en milieux organiques, protéiques, ou en milieux synthétiques d'une autre composition. Les auteurs ne tiennent pas compte de ce qui a été décrit antérieurement ; ils n'indiquent pas les caractères comparatifs et donnent souvent un nom nouveau à un organisme déjà décrit, comme s'il s'agissait d'une espèce nouvelle. La conséquence de cette façon de procéder en ce qui concerne la classification, c'est que nous nous trouvons en présence d'un grand nombre d'espèces nouvelles qu'il est impossible de distinguer et de différencier. Tantôt des organismes complètement différents sont décrits comme appartenant à une seule et même espèce, tantôt des cultures d'organismes identiques sont considérées comme appartenant à des espèces différentes. Nous avons déjà (1955) donné des exemples de cette façon incorrecte de déterminer les espèces d'Actinomycètes et des méthodes erronées appliquées à l'identification des substances antibiotiques. Certains travaux mentionnent d'autre part que des espèces différentes d'Actinomycètes élaborent un antibiotique identique ; par exemple, on

(\*) Manuscrit reçu le 6 novembre 1958.



a décrit des producteurs de streptomycine qui appartiendraient à des espèces différentes ; la même chose s'est produite en ce qui concerne les producteurs d'actinomycine, de chloramphénicol, de viomycine, etc. D'après les auteurs de ces travaux, toutes les substances ci-dessus mentionnées peuvent être synthétisées par des cultures appartenant à des espèces différentes. Enfin, les auteurs ne font pas, en général, une analyse taxonomique exacte de l'organisme qu'ils décrivent.

L'absence de renseignements taxonomiques sur les producteurs d'antibiotiques est souvent cause qu'un travail est fait en double. Des microorganismes identiques sont étudiés, non seulement dans différents pays, mais souvent même par différents laboratoires et différentes personnes dans une même ville. Un seul et même antibiotique reçoit plusieurs désignations, comme s'il s'agissait de substances de nature chimique différente.

Tout ceci aboutit à une grande confusion, augmentant considérablement les difficultés que rencontrent non seulement les médecins praticiens ou spécialistes, mais aussi les chercheurs de laboratoire. Il est indispensable que soient mis au point des règlements ou des ententes entre spécialistes en ce qui concerne l'élaboration de principes unifiés auxquels devront se conformer tous ceux qui étudient les antibiotiques et les microorganismes qui les produisent. Un tel accord ne devra pas se limiter aux spécialistes d'un même pays, mais s'étendre aux chercheurs de tous les pays. Il faut promulguer des règles internationales sur la nomenclature et la classification des organismes producteurs d'antibiotiques. Il faut créer des centres spéciaux dans lesquels seront conservées des cultures standards et des antibiotiques standards.

Parmi les problèmes concernant la taxonomie, le plus important est un accord sur la notion d'espèce et les techniques de détermination des espèces. Dans des travaux antérieurs (1938-1949) j'ai décrit les conditions fondamentales qui caractérisent l'espèce chez les microorganismes en général et les Actinomycètes en particulier. Ces travaux ont montré que l'espèce est déterminée par l'ensemble des propriétés morphologiques, culturales et biochimiques. Comme chez les organismes végétaux plus élevés et comme en mycologie, les organes reproducteurs sont de la plus grande importance du point de vue taxonomique. Ceci est aisé à comprendre, puisque les propriétés en question ont une signification majeure ; elles sont fixées par l'hérédité et se transmettent de génération en génération.

L'expérience montre que les sporophores des Actinomycètes (ainsi que ceux des champignons) présentent des caractères externes extrêmement stables, qui ne sont pas modifiés par des influences extérieures. Jamais nous n'avons vu d'Actinomycète à sporophores

droits acquérir la propriété de former des sporophores spiralés ; de même la variabilité d'une espèce ne s'étend pas à l'apparition de formation de spores par segmentation chez les espèces qui forment des spores par fragmentation, et inversement.

Certaines propriétés culturales ont une valeur diagnostique. La pigmentation des cultures, en particulier, mérite la plus grande attention.

La pigmentation est déterminée par la présence de véritables pigments, c'est-à-dire de métabolites stables, de composition chimique définie, fixée par l'hérédité, tels que les caroténoïdes, les lipochromes, les anthocyanines, etc. La couleur des cultures peut dépendre d'un hasard de combinaison de certaines substances formées par les microorganismes avec des constituants du milieu, par exemple, des métaux tels que le cuivre, le zinc, le fer, le cobalt, etc. C'est un fait bien établi qu'avec les champignons et les bactéries, la présence de ces oligo-éléments donne aux cultures une certaine couleur. Les substances antibiotiques produites par *Act. aureofaciens* ou *Act. rimosus* dans un milieu au cuivre et zinc confèrent une couleur verte aux cultures ; dans un milieu au fer, une couleur rouge ; avec certains autres métaux, une couleur jaune (Albert, 1953). On sait que les cultures d'*Act. streptomycini*, qui synthétisent la streptomycine, lorsqu'elles sont réalisées sur des milieux spécifiques et dans des conditions données, confèrent au milieu une couleur vert bleu, rose, brun rose ou brun vert. Nous avons observé de telles couleurs avec d'autres souches : *Act. levoris*, *Act. vulgaris*, *Act. longisporis*, *Act. bacillaris*, *Act. toxicus*, *Act. globisporus*, etc. La couleur n'est pas stable ; elle est plus prononcée pendant les trois ou quatre premiers jours, puis disparaît graduellement laissant une coloration brune.

Cette coloration obtenue avec des Actinomycètes incolores pourrait en imposer pour une pigmentation des cultures provoquée par un organisme pigmenté. *Act. streptomycini* ou *Act. levoris*, qui ont une couleur bleu vert, pourraient être pris pour *Act. cyaneus*, et des cultures présentant une couleur rouge bleu ou bleu rougeâtre pourraient être considérées comme des *Act. violaceus*. Des souches donnant une couleur jaune citron pourraient être classées à tort comme des *Act. citreus* ou *Act. flavus*, etc.

La couleur des Actinomycètes peut dépendre d'un produit de décomposition intermédiaire de certaines substances, telles que la tyrosine.

Il est bien évident que la couleur des cultures telle que nous venons de la décrire a une signification taxonomique tout à fait différente de la véritable pigmentation et ne peut guère être utilisée pour une classification. Cependant, il n'est pas impossible que cette couleur donne des indications sur l'espèce en cause.

TABLEAU I. — Réactions d'antagonisme entre les Actinomycètes producteurs de globisporines.

	Act.strepto- mycini	Act.tox- icus	Act.le- voris	Act.vul- garis	Act.globi- sporus	Act.fluorescens (a)	Act.fluorescens (b)	Act.fluorescens (c)
<u>Act.streptomycini</u>	-	-	-	+	++	+	+	+
<u>Act.toxicus</u>	+++	-	-	+++	++	+	+	+
<u>Act.levoris</u>	+++	-	-	-	++	++++	++++	++++
<u>Act.vulgaris</u>	+++	+	-	-	+	++++	++++	+
<u>Act.globisporus</u>	++	++	-	+++	-	+	+	+
<u>Act.fluorescens (a)</u>	-	-	-	-	+	-	-	-
" (b)	++++	-	-	-	++	+	-	-
" (c)	++++	+	-	+	++	+	+	-

Jusqu'ici nous ignorons les substances qui provoquent ces réactions colorées ; il est possible qu'à l'avenir une meilleure connaissance des microorganismes révèle les conditions dont dépend la stabilité de cette propriété.

Les véritables pigments sont des métabolites constitutifs et, comme tels, peuvent être utilisés pour une classification des Actinomycètes.

Les caractères morphologiques et culturels ici décrits ne permettent pas de distinguer entre Actinomycètes et de les diviser en espèces. La structure des sporophores et des spores, la pigmentation des cultures sont des phénomènes trop généraux ; ils sont caractéristiques de groupes ou de familles, mais pas d'espèces. Des sporophores spiralés ou des sporophores sphériques-ovales peuvent se rencontrer dans différentes espèces : *Act. violaceus*, *Act. caëlicolor*, *Act. griseus*, etc. Des espèces complètement différentes peuvent avoir des spores identiques : droites, courtes, longues ou oblongues.

On peut faire exactement les mêmes remarques en ce qui concerne la pigmentation des cultures. Des espèces différentes d'Actinomycètes peuvent avoir une pigmentation identique. Ainsi, en 1941, nous avons isolé deux espèces d'Actinomycètes bleus qui formaient un pigment du type anthocyanine ; actuellement, on n'en compte pas moins de cinq.

Pour la subdivision des Actinomycètes en espèces, on ne peut également guère utiliser les caractères physiologiques qui sont mis en évidence par les examens courants de laboratoire, tels que capacité de liquéfier la gélatine, de décomposer l'amidon, de réduire les nitrates, d'attaquer le lait, etc. L'assimilation des substances nutritives, en particulier des substances carbonées, mérite plus de confiance. Les recherches montrent que certaines espèces assimilent des sucres du type raffinose, d'autres utilisent le rhamnose ou le lactose, quelques-unes n'utilisent aucun type de sucre (Kurusowa, 1951 ; Sähner et Ettlinger, 1957).

Dans notre laboratoire, nous utilisons un ensemble de caractères pour subdiviser les Actinomycètes en espèces : nous subdivisons en groupes ou sections en nous basant sur la structure des sporophores et des spores ainsi que sur la pigmentation de la culture. Dans chacune de ces sections, on distingue des souches apparemment monotypiques en se basant sur les manifestations antibiotiques et les caractères spécifiques d'antagonisme.

Nos observations et nos expériences nous ont amené à la conclusion que les antibiotiques sont des métabolites constitutifs, fixés par hérédité, et nous avons donc proposé de les utiliser pour différencier les espèces d'Actinomycètes (Krassilnikov et



TABLEAU II. — Spectre antibactérien des Actinomycètes producteurs de globisporines.

	Act.strepto- mycini	Act.Tox- icus	Act.le- voris	Act.vul- garis	Act.globi- sporus	(a)	(b)	(c)
<u>B. coli</u>	+	-	-	-	+	-	-	-
<u>B. prodigiosum</u>	+	-	-	-	+	-	-	-
<u>Staph. aurea</u>	+++	+	+	+	+	+++	+++	+++
<u>Bac. subtilis</u>	++++	+	+	+	+++	++++	++++	++++
<u>Mycob. B-5</u>	++++	-	--	-	++	+	+	+
<u>Sacchar. cerevisiae</u>	+++	-	++++	-	-	++++	-	-
<u>Willia anomala</u>	+++	-	++++	-	-	++++	-	-
<u>Sporobolomyces philippove</u>	++++	-	++++	-	-	++++	-	-
<u>Aspergillus niger</u>	+	-	+	-	+	+	-	-
<u>Verticillium dahliae</u>	++++	-	++++	-	-	+	+	+
<u>Penicillium chrysogenum</u>	-	-	+++	-	-	-	-	-
<u>Fusarium solani</u>	+	-	++	-	+	-	-	-

coll., 1952-1955). Nous avons mis au point une méthode permettant de subdiviser des microorganismes apparemment identiques. Cette méthode est basée sur la nature spécifique de l'antagonisme inter- et intraspécifique. Nous avons admis au départ que les antibiotiques sont une arme dans la lutte pour la vie, élaborée par l'espèce au cours de l'évolution. Ceci entraîne deux conséquences : a) chaque espèce d'Actinomycète doit, en raison de sa nature même, synthétiser des antibiotiques d'un type défini ; b) les antibiotiques que forment ces Actinomycètes sont spécifiques, chacun possédant son propre spectre d'activité ; ils sont sans action sur l'espèce dont ils sont originaires.

En ce qui concerne la première conséquence, nous avons signalé à l'époque que les propriétés qualitatives des antibiotiques sont déterminées, non par l'écologie, mais par les caractéristiques spécifiques du germe producteur. On sait que la streptomycine est formée par *Actinomyces streptomycini*, l'auréomycine par *Act. aureofaciens*, la longisporine par *Act. longisporus*, la lévorine par *Act. levoris*, etc. On ne connaît aucun cas scientifiquement prouvé de production de streptomycine ou d'auréomycine par d'autres espèces d'Actinomycètes. Les travaux indiquant qu'un seul et même antibiotique est produit par différentes espèces demandent à être soigneusement vérifiés. D'après nos résultats personnels, les auteurs qui avancent de telles assertions, ou bien font erreur quant à la détermination de l'espèce du germe producteur, ou bien confondent plusieurs substances antibiotiques produites par différentes espèces en les considérant comme un seul et même composé (Krassilnikov, 1955, 1956). Nos conclusions ont été pleinement confirmées au moyen de cultures originales que nous avons reçues de laboratoires de différents pays (A. I. Korenyako, A. G. Kuchaeva, 1957).

On sait que des caractères stables, fixés par l'hérédité et dépendant de facteurs biologiques, sont importants pour la classification des organismes. Afin de savoir si les propriétés antibiotiques des Actinomycètes constituent de tels caractères, nous avons effectué des recherches sur la variabilité des cultures. Il était important de savoir si la capacité de synthétiser des antibiotiques spécifiques était un caractère fixé par l'hérédité, ou si elle apparaissait et disparaissait, ou encore si elle se modifiait dans une direction ou dans une autre suivant les conditions dans lesquelles l'organisme était cultivé ; en d'autres termes, il fallait déterminer si l'on devait considérer les antibiotiques comme un caractère constitutif d'importance en ce qui concerne l'espèce, ou bien s'ils ne sont que des métabolites dont l'apparition est contingente.

Pour résoudre ces problèmes, il était également important de savoir si d'une seule et même espèce on pourrait obtenir des

variants qui synthétiseraient d'autres antibiotiques que ceux de la souche originelle, et, d'autre part, si l'on pourrait obtenir un même antibiotique à partir de variants d'une même espèce.

Pour ces recherches, nous avons utilisé des Actinomycètes appartenant à un seul groupe, c'est-à-dire des cultures constituées au départ par *Act. globisporus* seul. Actuellement, nous possédons huit espèces indépendantes dans ce groupe. Extérieurement, du point de vue de la structure des sporophores, de la couleur du mycélium et des propriétés culturales en général, toutes ces espèces sont semblables ; même un spécialiste expérimenté ne pourrait les distinguer d'après ces caractères.

Les propriétés spécifiques d'une substance antibiotique dépendent de son activité en tant qu'antibiotique. L'analyse montre que ces métabolites sont entièrement différents dans les diverses espèces du groupe produisant des globisporines. Le sous-groupe le plus important de ce groupe, comprenant la seule espèce *Act. streptomycini*, forme l'antibiotique universellement connu : la streptomycine. *Act. toxicus* forme un antibiotique toxique très actif, qui n'a rien de commun avec la streptomycine. La pneumonine, formée par *Act. vulgaris* (souche 070), diffère nettement des deux antibiotiques ci-dessus mentionnés en ce sens qu'elle n'a d'effet inhibiteur que sur le pneumocoque ; elle est sans action sur les bacilles ; elle possède d'autres propriétés chimiques, physiques et thérapeutiques et n'est pas toxique ; elle exerce une action thérapeutique dans les infections expérimentales à pneumocoques. *A. levoris* produit de la léviorine, antibiotique agissant sur les levures et les champignons, sans effet sur les bactéries, mais fortement inhibiteur pour les levures, moins fortement pour les champignons. D'autres substances antibiotiques, synthétisées par d'autres espèces du groupe producteur de globisporines (*Act. bacillaris*, *Act. globisporus*, *Act. arabinosus* et *Act. fluorescens*), diffèrent également entre elles par divers caractères. Mais elles diffèrent surtout par leurs propriétés antibiotiques, c'est-à-dire par la nature spécifique de leur antagonisme réciproque (tableau I) et leur spectre anti-bactérien (tableau II).

Si l'on se base sur les caractères purement morphologiques ou culturels, on peut admettre que les espèces du groupe producteur de globisporines ici mentionnées sont phylogénétiquement semblables entre elles. S'il en est ainsi, en nous basant sur des questions de génétique pure, nous pouvons obtenir des variants monotypiques à partir de ces espèces. Cette analyse génétique est faite en comparant les variants obtenus à partir des différents microorganismes étudiés. Au moyen de cette méthode de variabilité expérimentale, nous avons établi l'existence d'un rapport entre certaines bactéries appartenant au groupe *Pseudomonas* et

différents groupes d'Actinomycétales : Actinomycètes, Proactinomycètes, Mycobactéries [Krassilnikov, 1938, 1947] (1).

Nous avons donc soumis des échantillons d'*Act. streptomycini*, *Act. globisporus*, *Act. fluorescens*, *Act. levoris* et *Act. vulgaris* à l'analyse génétique. Pour obtenir des variants, nous avons employé la méthode qui consiste à interférer avec l'hérédité et la méthode des cultures pures (breeding). Dans le premier cas, les cultures étaient soumises à l'action d'agents particuliers, par exemple rayons ultraviolets, actinophages, antibiotiques, température supérieure à l'optimum, etc. Nous avons également étudié les variants obtenus « spontanément », c'est-à-dire sans aucun traitement.

Au total, nous avons plus de 130 variants : 73 provenaient de 10 souches d'*Act. streptomycini* ; 18 de 3 souches d'*Act. globisporus* ; 11 de 4 souches d'*Act. toxicus* ; 16 de 4 souches d'*Act. levoris* ; 9 de 3 souches d'*Act. fluorescens* (b) ; 8 de 3 souches d'*Act. vulgaris*.

À l'intérieur de chaque espèce, les variants différaient les uns des autres par le mode de développement des colonies, par la graduation des couleurs du mycélium aérien (jaune pâle, jaune pâle brillant, jaune pâle blanc ou sale, etc.). Chez certains variants la partie inférieure des colonies était incolore ; chez d'autres, elle était brune et quelquefois brun rouge. Dans un milieu SRII (2) au glucose, certains variants conféraient une couleur bleue au substrat ; d'autres une couleur rose, rose brun ou vert brun, ou simplement une couleur brune. De nombreux variants restaient incolores dans tous les milieux malgré des conditions de culture différentes.

Au cours de ces recherches, nous n'avons pas observé de variations spécifiques dans le mycélium, les sporophores ou les spores, non plus que dans les propriétés physiologiques ou biochimiques. Chez quelques variants nous avons seulement noté une diminution de certaines capacités fermentaires, par exemple la liquéfaction de la gélatine, la décomposition des sucres, la fermentation des acides, etc.

Chez quelques variants, les différences ci-dessus mentionnées ressortaient de façon évidente. Si leur origine n'avait pas été connue, ces variants auraient été pris pour des espèces séparées.

En même temps que nous suivions les propriétés culturales, morphologiques et physiologiques, nous avons recherché avec

(1) Toutes les nouvelles espèces ici mentionnées seront décrites dans un travail ultérieur.

(2) La composition des milieux nutritifs SRII et autres est décrite dans l'ouvrage de N. Krassilnikov, *Antagonistes et substances antibiotiques pour les Actinomycètes*, Moscou, 1950.

la plus grande attention les modifications des caractères antibiotiques. Les variants étudiés étaient cultivés dans des milieux nutritifs différents et dans des conditions de culture différentes, au repos ou en culture agitée. Sachant que la composition du milieu et les conditions d'aération jouent un rôle capital dans la formation des substances antibiotiques, nous avons expérimenté diverses sources nutritives et divers degrés d'aération.

Le résultat de toutes ces recherches fut l'obtention de variants présentant des degrés d'activité antibiotique divers, soit élevée, soit faible. Parmi les nombreux variants d'*Act. streptomycini* nous avons des souches pratiquement dépourvues de pouvoir antibiotique : pas plus de 5 à 20 unités/ml dans des conditions de culture optimum ; mais il y avait aussi des souches dont l'activité était cinq à dix fois plus grande que celle de la culture originelle (tableau III).

TABLEAU III. — **Activité des variants d'*Act. streptomycini*.**

Souche originale .....	100-200	U/ml
Variants 510, 624 et autres .....	5-20	U/ml
Variants 113, 420, 525 et autres .....	200-300	U/ml
Variants 68, 75, 91, 684 .....	400-500	U/ml
Variants 88, 265 et autres .....	600-700	U/ml
Variants 24, 56 et 372 .....	700-800	U/ml
Variants 33, 38, 214 et autres .....	800-900	U/ml
Variants 305, 896 et autres .....	900-1000	U/ml

Des résultats semblables furent obtenus avec des variants d'autres espèces du groupe producteur de globisporines : diminution de l'activité chez certains variants, augmentation chez d'autres. Le plus souvent nous obtenions des variants caractérisés par une activité antibiotique réduite ; nous n'avons que très rarement obtenu des cultures possédant un pouvoir antibactérien élevé.

On voit donc que les propriétés antibiotiques des Actinomycètes peuvent subir des modifications assez prononcées quant à leur degré d'activité. Le tableau, en ce qui concerne les changements qualitatifs est différent. L'étude soignée des variants montra que ni le spectre antibactérien ni les propriétés spécifiques d'antagonisme réciproque ne subissaient aucune modification, ces deux caractères restant exactement les mêmes chez les variants et dans les cultures originelles.

Les 73 variants d'*Act. streptomycini* manifestèrent les mêmes propriétés antibiotiques que la culture mère : tous inhibaient le développement de bactéries Gram négatives (*B. coli*, *B. prodigiosum*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aurantiacus*, etc.), et de bactéries



Gram positives (staphylocoques, bactéries sporulées, Mycobactéries y compris *B. tuberculosis*) et de certaines levures ou champignons levuriformes, ainsi que de certains champignons. Manifestant des propriétés anti-Actinomycètes extrêmement prononcées, les 73 variants, exactement comme leurs souches mères, n'empêchaient pas le développement de leurs propres cultures, mais ils s'inhibaient réciproquement. Ils réagissaient les uns avec les autres comme les descendants d'une seule et même culture. Ils présentaient tous une réaction monotypique à l'action d'autres espèces d'Actinomycètes. En d'autres termes, les 73 variants, malgré une grande diversité de caractères cultureux, manifestaient les mêmes propriétés antibiotiques (c'est-à-dire les mêmes caractères d'antagonisme spécifique) que s'il s'agissait d'une seule et même culture.

Des résultats semblables ont été obtenus avec des variants d'autres espèces du groupe producteur de globisporines. Aucun des 18 variants obtenus à partir des 3 souches d'*Act. globisporus*, bien que différant profondément du point de vue culture, ne présente de changement soit du spectre antibiotique, soit des propriétés d'antagonisme réciproque intra ou interspécifique. Ces 18 variants, exactement comme s'il s'était agi d'une seule et même souche, inhibaient le développement des mêmes bactéries, levures et champignons que les trois souches originelles, ou que l'espèce-type de ce groupe.

Dans les 11 variants d'*Act. toxicus*, les 16 variants d'*Act. levoris* et les 8 variants d'*Act. fluorescens*, nous n'avons noté, en ce qui concerne les propriétés antibiotiques, aucune différence qualitative avec celles de la souche originelle.

Pour essayer de modifier les propriétés antibiotiques des Actinomycètes d'un groupe donné, nous avons employé la méthode de la variabilité induite, ou méthode de l'induction.

Dans une première série d'expériences, nous conservons des cultures d'*Act. streptomycini* dans un filtrat de divers variants d'*Act. globisporus*, *toxicus* ou *levoris*. La durée de ce traitement variait de dix heures à un mois et demi. Les cultures étaient gardées à la température du laboratoire : 25 et 37° (tableau III).

Dans une seconde série d'expériences, nous avons utilisé les phages comme porteurs de la substance transformatrice. On a décrit dans la littérature des expériences dans lesquelles certains phages étaient capables de transférer la substance transformatrice d'une culture à une autre, la souche réceptrice acquérant alors les propriétés de la souche inductrice. De telles modifications ont été décrites chez *E. coli* K12 avec le phage spécial  $\lambda$ . Sermoni (1957) a observé de pareils changements chez les Actinomycètes sous l'influence de certains actinophages : après injec-

tion d'un phage provenant d'une culture originelle pigmentée, un variant incolore d'*Act. caelicolor* donnait les colonies bleu foncé caractéristiques de la souche originelle.

Dans nos expériences, nous avons employé 19 actinophages différents. Ces phages étaient spécifiques (monovalents, actifs seulement sur l'Actinomycète en expérience), ou non spécifiques pour les cultures en expérience (phages polyvalents). Dans les expériences de la première et de la seconde série, 15 cultures différentes ont été soumises à l'action des phages. Elles appartenaient à trois espèces : 8 *Act. streptomycini*, 4 *Act. globisporus*, 3 *Act. levoris*. Le résultat de nos expériences a été négatif. Nous n'avons pas réussi à modifier les propriétés antibiotiques des souches en expérience en les traitant soit avec des filtrats de cultures inductrices, soit avec des phages. Comme dans les expériences précédentes, nous obtenions des variants qui différaient nettement des souches originelles du point de vue des caractères cultureux et de certains caractères physiologiques ; de nombreuses formes avaient un degré d'activité antibiotique différent, mais en aucun cas nous n'avons obtenu de variants qui manifestaient des propriétés antibiotiques qualitativement différentes de celles de la souche mère. Nous n'avons jamais pu constater, par exemple, que les formes obtenues synthétisaient un antibiotique nouveau, ne possédant pas les propriétés de celui de la souche originelle : tous les variants d'*Act. streptomycini* synthétisaient la streptomycine ou la globisporine ; à partir des variants d'*Act. levoris*, nous n'avons obtenu que de la léviorine, et aucun antibiotique d'une autre espèce.

De même nous n'avons observé aucune modification qualitative dans les propriétés antibiotiques du groupe des globisporines. Les antibiotiques caractéristiques d'*Act. toxicus*, *Act. vulgaris*, *Act. globisporus* ou *Act. fluorescens* se retrouvaient identiques dans leurs variants ; la seule différence était l'intensité de leur formation et de leur accumulation dans le milieu.

Ainsi donc, les caractéristiques antibiotiques sont des propriétés extrêmement stables et solidement fixées par l'hérédité. De même que les propriétés morphologiques des bactéries sporulées (structure des sporophores et des spores), la capacité de synthétiser des antibiotiques ne subit pas de modification qualitative sous l'influence d'actions extérieures quelles que soient les conditions où se trouvent placés les microorganismes producteurs.

La stabilité des propriétés antibiotiques que nous venons de décrire n'est pas un cas particulier au groupe des globisporines. Nous avons observé cette stabilité fixée par l'hérédité dans d'autres groupes d'Actinomycètes, par exemple dans les formes

grises (*Act. griseus*), les formes blanches (*Act. albus*) et les formes pigmentées (*Act. violaceus*, *Act. caelicolor*, *Act. aurantiacus*).

Sur la base des faits décrits ci-dessus, nous sommes donc fondés à tirer les conclusions suivantes :

1° La production d'une substance antibiotique spécifique est un caractère extrêmement stable, transmis par l'hérédité. Ce caractère est plus stable que la capacité de synthétiser de nombreux autres métabolites.

2° Les antibiotiques sont hautement spécifiques et, en vertu de leur spécificité, ils déterminent la nature de l'interaction entre les bactéries qui les produisent. Grâce à ce caractère particulier, les bactéries antagonistes qui forment des antibiotiques peuvent être différenciées et classées.

3° Les antibiotiques, en tant que propriétés spécifiques biologiques essentielles, doivent être employés pour la classification des Actinomycètes, et peut-être pour celle de tous les micro-organismes.

4° Cependant, la propriété en question n'a de valeur qu'autant qu'elle accompagne des propriétés morphologiques, culturales et physiologiques ; elle ne peut pas être utilisée comme propriété de base.

5° Les antibiotiques et la nature spécifique de l'antagonisme doivent être utilisés comme indicateurs secondaires, hautement caractéristiques des espèces, mais seulement pour établir des subdivisions entre groupes de bactéries antagonistes dont les propriétés morphologiques et culturales sont identiques.

## SUMMARY

### THE DIFFERENTIATION OF ACTINOMYCETES BY THE METHOD OF EXPERIMENTAL VARIABILITY.

On the basis of the material set forth above, we are justified in reaching the following conclusions.

1. Specific antibiotic substances are a highly stable property, transmitted by heredity. This property is more stable than the capacity to synthesize many other metabolites.

2. Antibiotics are highly specific and by virtue of their specificity they determine the nature of the interaction between the bacteria which produce them. Thanks to these peculiar characteristics, the bacterial antagonists which form specific antibiotics can be satisfactorily differentiated and distinguished.

3. Antibiotics, as a specific, biologically essential property, should be used in the classification of actinomycetes and, possibly, in that of all microorganisms.

4. However, the property in question is valid only in conjunction with morphological, cultural and physiological properties. It cannot be used as a basic property.

5. Antibiotics and the specific nature of antagonism should be used as a secondary, highly characteristic indicator of species only for purposes of establishing subdivisions between groups of bacterial antagonists which are similar with respect to morphology and culture.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALBERT (A.). *Nature*, 1953, **172**, 201 ; *Biochem. J.*, 1953, **54**, 297.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Ray Fungi and related Organisms*, Moscou, 1938.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Manual for determining Ray Fungi*, Moscou, 1941.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Manual for Determining Bacteria and Actinomycetes*, Moscou, 1949.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Zhurn. Obshchei Biol.*, 1947, 8/1.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Actinomycetes Antagonists and antibiotic Substances*, Moscou, 1950.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Intraspecific and interspecific Antagonism in Microorganisms*, DAN SSSR, New Series, 1951, 77/1.
- KRASILNIKOV (N. A.). *Antagonistic interspecific and intraspecific Interrelations in Microorganisms*, Uspekhi sovr. biol., 1951, 31/3.
- KRASILNIKOV (N. A.). *The Classification of Antibiotics producing Actinomycetes*, Studies of the International Symposium, 1955-1956, 1-7/11, Varsovie. Studies of the First Conference on Antibiotics, 1955-1957, Moscou.
- KRASILNIKOV (N. A.), KORENYAKO (A. I.), SKRYABIN (G. K.) et NIKITINA (N. I.). *The Specific Characteristics of interspecific Antagonism as a Principle for the Recognition and Subdivision of Species in Microorganisms*, DAN SSSR 77/4.
- KORENYAKO (A. I.) et NIKITINA (N. I.). *Report on the Second All-Union Conference on Antibiotics*, mai 1957.
- KUSHAEVA (A. G.). *Report on the Second All-Union Conference on Antibiotics*, mai 1957.
-

# FACTEURS NUTRITIFS INFLUENÇANT LA CROISSANCE DU VIRUS DE L'HERPÈS DANS LA SOUCHE DE CELLULES L DE EARLE

par J. PELMONT et H. R. MORGAN (\*).

(Louis A. Wehle Virus Research Laboratory  
Department of Bacteriology, University of Rochester  
School of Medicine and Dentistry,  
Rochester, New York)

La souche de fibroblastes d'origine murine isolée par Earle [1] demeure longtemps viable *in vitro* sans signe apparent de prolifération dans un milieu composé d'acides aminés et de vitamines hydrosolubles [2]. Ces cellules sont néanmoins sensibles à l'infection par le virus de l'herpès. Ce système est très utile pour la détermination des facteurs nutritifs influençant la prolifération des virus, et, dans le cas du virus de la psittacose, a rendu possible l'identification des acides aminés essentiels pour la croissance de ce virus [2]. Les résultats rapportés ici révèlent que le virus de l'herpès peut se développer dans ce système *in vitro* et qu'il est possible de démontrer que certains acides aminés sont nécessaires à sa croissance.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE.

*Le virus* : Nous avons utilisé la souche HF d'herpès, maintenue dans le laboratoire par passages successifs dans le sac vitellin d'embryons de poulet. Les suspensions de virus préparées en bouillon nutritif par homogénéisation de sacs vitellins infectés, furent mises en ampoules scellées et maintenues au frigorifique à  $-60^{\circ}\text{C}$ .

## TITRAGE DU VIRUS.

Les titrages de virus furent effectués en inoculant  $0,2\text{ cm}^3$  de suspension sur la membrane chorio-allantoïque d'œufs embryonnés de 12 jours. Six embryons furent utilisés pour chaque dilution. Après un séjour à l'étuve à  $35^{\circ}$  pendant quarante-huit heures, les lésions

(\*) Manuscrit reçu le 1<sup>er</sup> décembre 1958.



sur la membrane furent comptées et le nombre d'unités infectantes (Pock-Forming Units [P. F. U./ml]) par centimètre cube d'inoculum fut calculé.

#### LES CULTURES DE TISSUS.

Les cellules furent cultivées dans un milieu contenant 0,17 p. 100 d'hydrolysate de lactalbumine (1), 0,07 p. 100 d'extrait de levure (2) dans la solution de Earle, additionné de sérum de cheval dont le taux fut ajusté à 20 p. 100 du volume total [3]. Toutes les cultures étaient préparées dans des boîtes T60 (3) pour le maintien du stock et T15 pour l'expérimentation (T flasks), dont les surfaces utiles pour la réception des cellules sont respectivement de 60 et de 15 cm<sup>2</sup>.

#### MILIEU SYNTHÉTIQUE.

Le milieu synthétique utilisé (tableau I) était le même que celui utilisé au cours des études sur la psittacose [2]. Pour l'étude individuelle des acides aminés, le milieu synthétique fut carencé sélectivement et, dans certains cas, l'acide aminé fut remplacé par un analogue correspondant.

TABLEAU I. — Milieu synthétique pour les cellules L.

	MG/LITRE		MG/LITRE
ACIDE DL-ASPARTIQUE	60	NIACINE	0,025
L-ARGININE	70	NIACINAMIDE	0,025
ACIDE-DL-GLUTAMIQUE	150	THIAMINE	0,010
GLUTAMINE	100	RIBOFLAVINE	0,010
L-HISTIDINE	20	PANTOTHENATE DE Ca	0,010
L-LYSINE	70	PYRIDOXINE	0,025
DL-TRYPTOPHANE	20	PYRIDOXAL	0,025
L-TYROSINE	40	INOSITOL	0,050
DL-PHENYL-ALANINE	50	AC. P-AMINOBENZOÏQUE	0,050
L-CYSTINE	20	CHOLINE	0,500
L-CYSTEINE	100	BIOTINE	0,010
DL-METHIONINE	30	AC. FOLIQUE	0,100
DL-SERINE	50		
DL-THREONINE	60		MG/LITRE
DL-LEUCINE	120	NaCl	6,8
DL-ISOLEUCINE	40	KCl	0,4
DL-VALINE	50	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,2
GLYCINE	50	Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0,14
DL-ALANINE	50	CaCl <sub>2</sub>	0,2
DL-PROLINE	40	GLUCOSE	1,0
L-HYDROXYPROLINE	10	NaHCO <sub>3</sub>	2,2
		ROUGE DE PHENOL	0,02
PENICILLINE	200.000 U./L,	STREPTOMYCINE	50 MG/L

#### RÉSULTATS.

1° *Passages en série du virus de l'herpès en cellules L.* — Nos expériences ont confirmé les observations antérieures de Scherer [4] et de Singh et Merchant [5], à savoir : que le virus

(1) Nutritional Biochemical Inc., Cleveland, Ohio.

(2) Difco, Detroit, Michigan.

(3) Konte Glass Co., Vineland, New Jersey.

de l'herpès prolifère en cultures de cellules L maintenues dans un milieu à base d'extrait de levure, d'hydrolysât de lactalbumine et de sérum de cheval. Les titres des premiers passages étaient faibles, mais dès le seizième passage, la croissance du virus était plus rapide, produisant un effet cytopathogène décelable le quatrième jour après l'inoculation et atteignant un titre très élevé dans le liquide surnageant. L'effet cytopathogène du virus se traduisait par des lésions localisées formant des foyers de dégénérescence arrondis.

*2° Croissance du virus en milieu synthétique.* — Les cellules L maintenues dans le milieu synthétique seul ont survécu pendant très longtemps sans signe évident de prolifération [2]. Lorsque de telles cultures furent infectées, le virus de l'herpès proliféra facilement et atteignit des titres correspondant à ceux obtenus dans le milieu contenant du sérum de cheval. Cependant, lorsque les cellules infectées étaient maintenues pendant plusieurs jours dans la solution de Earle seule, la multiplication du virus n'était pas évidente, et les cellules ne semblaient pas altérées pendant environ six jours ; de plus, on ne pouvait détecter la présence du virus dans ces cellules. Cependant, si l'on remplaçait le milieu synthétique par un milieu complet contenant du sérum de cheval, le virus croissait rapidement, indiquant qu'il y avait une infection latente.

*3° Croissance du virus en milieu sélectivement carencé avec ou sans substitution de l'acide aminé analogue correspondant.* — Ayant établi que le virus est capable de proliférer dans un milieu synthétique, il nous a semblé intéressant de déterminer l'importance des acides aminés, soit en les retranchant sélectivement du milieu synthétique ou, encore, en les retranchant et en substituant les acides aminés analogues correspondants, qui auraient pour effet d'inhiber le métabolisme des acides aminés persistant à l'intérieur des cellules.

Les cultures de cellules L furent préparées dans des boîtes de culture (T flasks) contenant environ  $10 \times 10^6$  cellules. Ces cellules furent traitées pendant deux jours avec la solution de Earle afin de les débarrasser des restes d'acides aminés. Les cultures furent ensuite infectées avec la même quantité de virus ( $10^4$  ou  $10^5$  unités infectantes [P. F. U./ml] par centimètre cube) diluée dans le milieu de culture synthétique approprié, déficient ou complet. Le liquide surnageant fut remplacé au bout de six heures, et par la suite tous les jours avec le milieu de culture approprié. Les titrages du virus des liquides de culture furent effectués le jour où les cultures témoins en milieu synthétique complet montrèrent des lésions de dégénérescence évidente. Les résultats pré-

sentés dans les tableaux II, III et IV indiquent que l'élimination des acides aminés, avec ou sans addition des acides aminés analogues correspondants, inhibe la croissance du virus. L'élimina-

TABLEAU II.

EXPERIENCE	MOMENT D'INTERRUPTION	MILIEU COMPLET	SANS METHIONINE	TITRES DU VIRUS						
				ETHIONINE MG/L						
				0,075	1,5	3,0	6,0	15	30	60
A	3 JOURS	5,3 <sup>1</sup>	4,0	3,9	4,3	4,5	3,6			
B	4 JOURS <sup>2</sup>	6,4	5,4	5,3	4,3	4,4	4,2			
C	3 JOURS	6,3	5,3				5,1	4,8	4,8	PAS DE VIRUS

<sup>1</sup> Les titres sont exprimés par leur logarithme. — <sup>2</sup> Dans cette expérience les cellules n'ont pas été déprimées par passage dans la solution de Earle.

TABLEAU III.

EXPERIENCE	MOMENT D'INTERRUPTION	MILIEU COMPLET	SANS PHENYL-ALANINE	TITRES DU VIRUS				
				$\beta$ -2-THIENYL-ALANINE MG/L				
				3,0	6,0	12,5	25	50
D	4 JOURS	5,2 <sup>1</sup>	2,0	PAS DE VIRUS	PAS DE VIRUS	PAS DE VIRUS		
E	6 JOURS	6,6	4,4	3,9	<2	<2	PAS DE VIRUS	PAS DE VIRUS
F	3 JOURS	5,2	3,3					

<sup>1</sup> Les titres sont exprimés par leur logarithme.

TABLEAU IV.

EXPERIENCE	MOMENT D'INTERRUPTION	MILIEU COMPLET	SANS TRYPTOPHANE	TITRES DU VIRUS			
				METHYL-TRYPTOPHANE MG/L			
				0,5	2,5	2,6	20
G	3 JOURS	6,4 <sup>1</sup>	3,9		2,7	2,6	PAS DE VIRUS
H	4 JOURS	5,5	2,3	2,3	2,2	PAS DE VIRUS	

<sup>1</sup> Les titres sont exprimés par leur logarithme.

tion de la méthionine a un effet beaucoup moins marqué que l'élimination de la phénylalanine et du tryptophane. L'emploi des trois analogues éthionine,  $\beta_2$ -thiénylalanine ou méthyltryptophane, produisit un effet suppressif plus marqué sur la croissance du virus, quoique ces trois analogues fussent toxiques pour les cellules, excepté l'éthionine à faible concentration (de l'ordre de 6 mg/l de culture). Par ailleurs, ces faibles concentrations d'éthionine étaient moins efficaces pour la suppression de la multiplication du virus.

Avec l'emploi de fortes concentrations d'éthionine (60 mg/l) aucun virus infectieux ne put être récupéré, malgré la persistance de quelques cellules viables sept jours après l'infection. Cependant, lorsque le milieu de culture fut remplacé par un milieu complet comprenant du sérum de cheval, les cellules reprirent leur activité et la multiplication du virus devint évidente, indiquant une période d'infection latente. Cette méthode de carence sélective fut appliquée à dix autres acides aminés, sans toutefois pratiquer la substitution des acides aminés analogues (voir tableaux V et VI), et les titrages du virus furent effectués le

TABLEAU V.

MILIEUX	TITRES DU VIRUS			
	EXPERIENCE I		EXPERIENCE J	
	3 JOURS	4 JOURS	3 JOURS	4 JOURS
MILIEU COMPLET	6,5 <sup>1</sup>	<1 <sup>2</sup>	6,5 <sup>2</sup>	
SANS ARGININE	3,0	2,9	3,0	4,3
" THREONINE	3,0	3,7	3,6	4,1
" LEUCINE	3,9	4,3	3,4	4,8
" ISOLEUCINE	5,9	5,2 <sup>2</sup>	5,7	
" LYSINE	6,6 <sup>1</sup>	<1 <sup>2</sup>	5,8 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> Les titres sont exprimés par leur logarithme. — <sup>2</sup> Cultures totalement détruites par le virus.

TABLEAU VI.

MILIEUX	TITRES DU VIRUS	
	EXPERIENCE K	EXPERIENCE L
	3 JOURS	3 JOURS
MILIEU COMPLET	5,5	6,1
SANS GLUTAMINE	5,4	6,0
" ALANINE	5,5	6,1
" GLYCINE	5,3	5,9
" VALINE	<1	3,8
" HISTIDINE	<2	3,7

troisième ou quatrième jour de l'expérience. Les résultats montrent que l'absence d'arginine, de thréonine, de leucine, de valine ou d'histidine réduit de façon marquée la multiplication du virus de l'herpès, tandis que les acides aminés iso-leucine, lysine, alanine et glycine semblent avoir peu d'effet sur cette multiplication. La carence en glutamine était également sans effet.

#### DISCUSSION.

Le fait que le virus de l'herpès peut se multiplier en cellules L maintenues dans un milieu synthétique inhibant la croissance des cellules indique que le virus peut se reproduire dans des cellules au repos. Ceci a également permis l'étude des acides aminés qui sont importants pour la prolifération du virus.

L'observation que la suppression, dans le milieu de culture, de la phénylalanine, du tryptophane, de l'arginine, de la thréonine, de la leucine, de la valine et de l'histidine inhibe la croissance du virus de l'herpès, tandis que la suppression de l'isoleucine, de la lysine, de l'alanine et de la glycine n'a que peu d'effet, fournit des points de comparaison intéressants avec les autres virus dont les besoins nutritifs sont connus. Le virus de la poliomyélite semble avoir des exigences nutritives encore plus simples pour sa croissance en cultures de cellules HeLa, puisque ce virus ne requiert que la glutamine et le glucose [6]. Le virus de la psittacose, d'autre part, requiert pour sa croissance en cellules L [2] les acides aminés : tyrosine, thréonine, méthionine, isoleucine, phénylalanine, tryptophane, leucine, valine, cystéine et cystine. Il semble que le virus de l'herpès ressemble beaucoup plus au virus de la psittacose quant à ses exigences nutritives, même si le virus de l'herpès ne requiert pas d'isoleucine pour sa croissance dans les conditions de nos expériences. Cependant, tant que nous ne connaissons pas la teneur en acides aminés libres à l'intérieur des cellules, il sera difficile de déterminer si les divers acides aminés que l'on considère comme essentiels pour la croissance de certains virus ne diffèrent pas les uns des autres simplement par leur pouvoir de diffusion. Les résultats présentés ici semblent indiquer que le virus de l'herpès est synthétisé à partir des acides aminés libres intracellulaires, puisque la suppression des acides aminés extracellulaires a pour effet de diminuer la production du virus. Les résultats de nos expériences avec la solution saline de Earle et avec l'éthionine semblent indiquer que le virus de l'herpès peut survivre à l'état latent dans les cellules L *in vitro*. Les recherches en cours ont pour but l'étude de ce phénomène.



## RÉSUMÉ.

Le virus de l'herpès peut proliférer dans les cellules L cultivées dans un milieu synthétique qui ne permet pas cependant la croissance des cellules elles-mêmes. D'autre part, le virus peut infecter, sans se multiplier, des cellules L maintenues dans la solution saline de Earle seule. Dans ce dernier cas, le virus semble survivre à l'état latent dans les cellules et ne devient actif que lorsque le milieu de culture est remplacé par un milieu complet et comprenant du sérum de cheval.

La suppression sélective des acides aminés phénylalanine, tryptophane, arginine, thréonine, leucine, valine et histidine entraîne un arrêt marqué de la croissance du virus de l'herpès en cellules L, tandis que les acides aminés isoleucine, lysine, alanine et glycine peuvent être éliminés du milieu sans réduction apparente de la prolifération du virus.

## SUMMARY

NUTRITIONAL FACTORS INFLUENCING THE GROWTH OF HERPES VIRUS  
IN THE STRAIN L CELLS OF EARLE.

Herpes virus is capable of proliferating in L cells maintained in a synthetic medium which, however, does not permit cellular growth. On the other hand, the virus can infect without multiplying in L cells maintained in Earle's balanced salt solution alone. In this last instance, the virus seems to survive in a latent phase in the cells and becomes active only when the culture medium is replaced by a complete growth medium containing horse serum.

The selective omission of the amino acids phenylalanine, tryptophane, arginine, threonine, leucine, valine and histidine results in a marked decrease in the rate of growth of herpes virus in L cells, while isoleucine, lysine, alanine and glycine can be removed without any effect on virus proliferation.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] SANFORD (K. K.), EARLE (W. R.) et LIKELY (G. D.). *J. nat. Cancer Inst.*, 1948, **9**, 229.
- [2] BADER (J. P.) et MORGAN (H. R.). *J. exp. Med.*, 1958, **108**, 617.
- [3] MORGAN (H. R.) et BADER (J. P.). *J. exp. Med.*, 1957, **106**, 39.
- [4] SCHERER (W. F.). *Am. J. Pathol.*, 1953, **29**, 113.
- [5] SINGH (H.) et MERCHANT (D. J.). *Bact. Proceed.*, 1958, 44.
- [6] EAGLE (H.) et HABEL (K.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 271.

# **SUR L'INFECTION A BORRELINAVIRUS EN CULTURE DE TISSUS D'INSECTES (\*) (\*\*)**

par K. AIZAWA et C. VAGO.

(Laboratoire de Cytopathologie, Alès [Gard], I. N. R. A.)

## **INTRODUCTION.**

Récemment plusieurs travaux ont envisagé de mettre au point ou de perfectionner la culture des tissus d'insectes en vue de l'étude *in vitro* des virus de Lépidoptères.

Sur de telles cultures de fibroblastes, nous avons suivi le mode d'infection et de développement des Borrelinavirus.

En effet, depuis les observations de Trager [2] sur la présence de corps d'inclusion dans les cellules de gonades femelles de *Bombyx mori* maintenues *in vitro*, de nouvelles possibilités de culture ont été mises à notre disposition. Celles-ci permettent notamment des précisions concernant l'introduction des éléments infectieux à un moment déterminé du développement de la culture et ceci en connaissant la fraction de centrifugation contenant les virus sous leur forme libre.

Ainsi, nous avons examiné l'effet sur les fibroblastes, de virus de plusieurs origines. D'abord ceux librement répandus dans l'hémolymphe de larves virosées, ensuite ceux reproduits dans les cellules cultivées *in vitro*. Enfin, l'évolution de cellules provenant d'insectes virosés a été suivie en culture.

## **INFECTION DES FIBROBLASTES A PARTIR DES VIRUS PROVENANT DE L'INSECTE ATTEINT.**

En dehors des virus inclus dans les corps polyédriques, l'hémolymphe des insectes atteints contient également des virus libres, infectieux par injection. Leur forme n'est probablement pas identique à celle des bâtonnets provenant des corps d'inclusion dissous. Nous avons choisi ces éléments pour déclencher la pathogénèse également *in vitro*.

(\*) II<sup>e</sup> Colloque internat. Commission internat. Lutte biol., Paris, octobre 1958.

(\*\*) Manuscrit reçu le 21 novembre 1958.

MÉTHODES. — Une larve de *B. mori* au cinquième âge est saignée aseptiquement au stade de la polyédrie où la lyse cellulaire est encore peu avancée. L'hémolymphe est ensuite centrifugée à 5 000 t/mn pendant dix minutes.

Le surnageant est dilué mille fois dans le milieu de culture dont nous avons signalé antérieurement la composition [3, 4], complété de 10 p. 100 de sang de larves précipité, congelé et décongelé. Ce dernier mélange sert directement pour l'infection des cultures.

Les fragments de gonades femelles de larves de *B. mori* sont cultivés suivant les méthodes de la goutte pendante ou des tubes aplatis. A 30° C, la formation des fibroblastes est assez abondante au bout de deux à trois jours.

A ce moment-là, on remplace aseptiquement le milieu par celui qui est infecté. La culture se poursuit à 30° C, les observations étant faites au contraste de phase au cours de son développement.

OBSERVATIONS. — Les fibroblastes se présentent au moment de l'infection sous forme de cellules allongées, avec des pseudopodes ramifiés dans tous les sens. Leur vacuolisation est variable, mais d'une façon générale, réduite.

Pendant quarante-huit heures environ, aucun changement notable n'est enregistré. Ensuite, les pseudopodes sont moins étalés et moins nombreux, ce qui donne aux cellules un aspect plus arrondi.

L'arrondissement devient de plus en plus net et les pseudopodes se résorbent. Les dimensions des noyaux sont nettement supérieures à celles des fibroblastes non infectés.

Ces altérations pourraient être comparées aux changements de forme observés quelquefois dans les cultures de cellules normales en voie de vieillissement ou se trouvant dans un milieu épuisé.

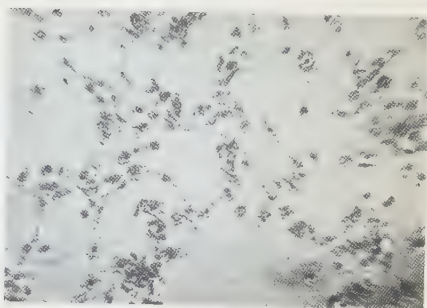
Cependant, les lésions de l'infection à virus présentent certaines particularités, notamment la rapidité de réduction des pseudopodes et la forte hypertrophie du noyau. Ce dernier présente, en outre, des signes particuliers.

#### LÉGENDE DE LA PLANCHE

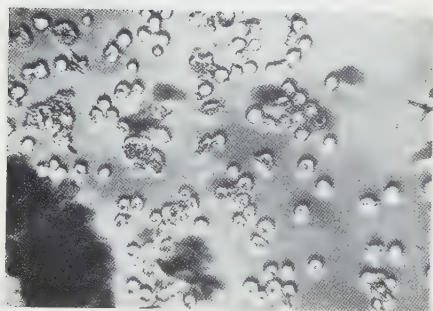
Fibroblastes d'ovaire nymphal de *Bombyx mori* cultivés *in vitro*. Altérations après infection à *Borrelinavirus bombycis* provenant de l'hémolymphe larvaire (28° C). Contraste de phase : 400 ×. a) Sans infection. Fibroblastes normaux ; b) Trois jours après infection. Premières lésions ; c) Quatre jours après infection. Arrondissement ; d) Six jours après infection. Début de lyse avec polyèdres ; e) Huit jours après infection. Désagrégation ; f) Neuf jours après infection. Libération des polyèdres.



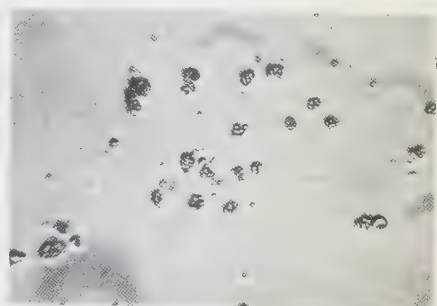
*a*



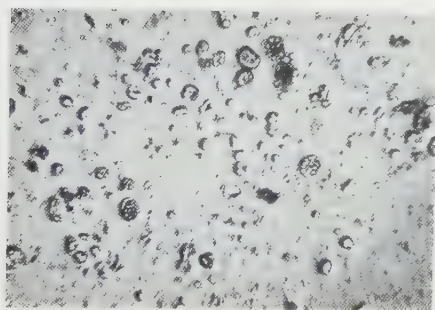
*b*



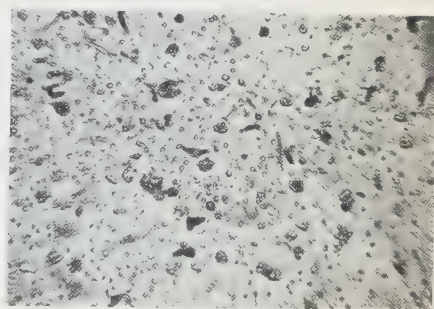
*c*



*d*



*e*



*f*





En effet, quatre ou cinq jours après l'infection les noyaux contiennent de minuscules corps réfringents. Ces éléments augmentent peu à peu de diamètre et remplissent entièrement le noyau. Plus tard, on distingue leur contour polyédrique. A ce stade, le cytoplasme des cellules infectées est pratiquement invisible et la cellule se présente comme une faible partie colorée entourant un agglomérat de corps polyédriques.

Vers le sixième jour après l'infection, les polyèdres se trouvent non seulement dans les cellules, mais également libres dans le milieu et on remarque des noyaux remplis de polyèdres en voie de désagrégation. Ceci signifie que l'infection est arrivée à la dernière phase de la pathogénèse virale.

A partir de ce moment, on trouve dans les cultures les différents stades d'évolution de l'infection, c'est-à-dire des fibroblastes peu altérés, certains avec corps réfringents et d'autres, enfin, en voie de désagrégation.

Le milieu contient de plus en plus de polyèdres libres séparés ou groupés. Ils ont la forme habituelle des corps d'inclusion observés dans les larves, leur taille varie entre 1 à 5  $\mu$ . Ils peuvent être obtenus purs par dilution de la culture suivie de sédimentation différentielle.

#### INFECTION DES FIBROBLASTES

##### A PARTIR DES VIRUS FORMÉS EN CULTURE DE TISSUS.

Il était intéressant d'examiner également l'action de virus n'ayant pas été produits par l'organisme vivant. En effet, les cellules isolées maintenues *in vitro* en milieu semi-synthétique paraissent susceptibles, après infection, de donner naissance à des virus libres. Nous avons inoculé de tels virus à une nouvelle culture de fibroblastes.

MÉTHODES. — Une culture de tissus de gonades femelles de larves de *B. mori*, au cours du développement de la pathogénèse du virus, est diluée dans un milieu de culture. Cinq cultures en gouttes pendantes montrant le début de la formation des polyèdres et représentant ensemble 1 cm<sup>3</sup> de liquide environ sont mélangées à 4 cm<sup>3</sup> de milieu.

Après centrifugation à 6 000 t/mn pendant dix minutes, le surnageant est dilué dix fois, toujours avec du milieu.

Une culture de fibroblastes d'ovaire nymphal âgée de 48 heures est infectée, en remplaçant la goutte de milieu par le liquide contenant le surnageant de la culture virosée.

OBSERVATIONS. — On assiste à l'arrondissement irrégulier et progressif des cellules, comme après infection avec le virus pro-

venant de l'insecte vivant. Les corps réfringents ne commencent à apparaître qu'au bout de six à sept jours et les contours polyédriques ne s'observent que deux jours plus tard. Le processus se termine également dans ce cas par l'éclatement des cellules et la mise en liberté des polyèdres.

Cette source d'infection déclenche donc des altérations montrant toutes les caractéristiques propres à l'action des Borrelinavirus.

#### CULTURE DES CELLULES D'UN INSECTE VIROSÉ.

Nous savons qu'avant l'apparition des lésions sur un insecte l'infection à polyèdres présente une période latente pendant laquelle le début de la pathogénèse cellulaire est déjà en cours. Il est même probable qu'une phase d'inactivité s'intercale entre l'infection et la multiplication des virus [1]. Compte tenu de cette période peu éclaircie, nous avons essayé d'étudier le comportement *in vitro* des cellules séparées de l'organisme vivant au début du processus de la pathogénèse.

MÉTHODES. — Dans ce but les gonades femelles ont été prélevées sur des larves de *B. mori* au cinquième âge, infectées auparavant par voie buccale avec une suspension de polyèdres et ne présentant encore aucun signe de maladie.

Les fragments de gonade ont été alors mis en culture selon la technique préalablement décrite [3, 4].

OBSERVATIONS. — On distingue plusieurs cas entre lesquels des stades intermédiaires peuvent se présenter.

a) Si les gonades sont prélevées peu de temps après l'infection de la larve, la migration des fibroblastes est normale et la culture se déroule sans altérations. Ce fait montre que les virus n'ont pas encore touché les gonades depuis l'infection de la larve. Cette période excède rarement trois jours à 22° C.

b) Même après une telle durée, les cellules n'ont souvent pas de lésions au moment de la mise en culture. Leur migration est normale. Elles peuvent couvrir une grande surface et présenter des mitoses. Cependant, ces fibroblastes montrent par la suite des signes de dégénérescence. Au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures de culture ils s'arrondissent et on note l'apparition progressive de polyèdres intranucléaires.

c) Dans les cas où on décèle des lésions ou la présence de corps d'inclusion au moment de la mise en culture des fragments, la migration des fibroblastes est faible et irrégulière. Les altérations caractéristiques se développent rapidement et les cellules se désintègrent au bout de deux à trois jours.

## CONCLUSIONS.

Ces expériences montrent que dans les fibroblastes d'ovaire de Lépidoptère cultivés *in vitro* un processus de pathogénèse caractéristique peut être déclenché par différents modes d'infection à virus.

Les virus libres non inclus dans des polyèdres, purifiés à partir de l'hémolymphe de larves atteintes, sont hautement infectieux pour les fibroblastes.

Les virus produits *in vitro* en dehors d'un organisme vivant sont susceptibles de déclencher la pathogénèse sur cellules en culture.

Enfin, pour les cellules en voie d'infection dans le corps de l'insecte que l'on transfère *in vitro*, on note la continuation du processus de l'altération et la formation des polyèdres.

La culture de fibroblastes semble non seulement convenir à l'étude des détails de la pathogénèse virale, mais également aux tests de la présence de virus dans une matière quelconque ainsi qu'à la reconnaissance de l'infection dans les cellules d'un insecte.

D'un autre côté, ces observations concentrent l'attention sur les risques d'accidents et d'erreurs d'interprétation pour les cultures de tissus par suite de l'éventuelle mise en culture de cellules d'insectes en voie d'infection sans signes cytologiques.

## RÉSUMÉ.

Le processus de pathogénèse caractéristique du *Borrelinavirus* a été observé et suivi en culture de tissus de gonades de *Bombyx mori* en partant :

- a) De virus libres du sang d'insectes virosés ;
- b) De virus libres produits en culture de tissus ;
- c) De cellules faiblement infectées et explantées.

Ces résultats positifs montrent également que la culture de tissus peut constituer une méthode de test pour virus d'insectes.

## SUMMARY

ON THE INFECTION WITH *Borrelinavirus* IN INSECT TISSUE CULTURE.

The process of the infection with *Borrelinavirus* was observed by tissue culture using the ovarian tissue of *Bombyx mori*.

Infections were induced by means of :

- a) Free virus in the infected blood of the silkworm.

b) Free virus obtained from the liquid phase of the tissue culture.

c) The explants derived from the silkworm in the early period of the infection.

These positive results show that tissue culture also represent a method for testing the presence of virus in insects.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] AIZAWA (K.). *Symp. Kanto Branch. Seric. Soc. Japan*, 1956, **3**, 42.
- [2] TRAGER (W.). *J. exp. Med.*, 1935, **51**, 501-513.
- [3] VAGO (C.) et CHASTANG (S.). *Experientia*, 1958, **14**, 110.
- [4] VAGO (C.) et CHASTANG (S.). *Experientia*, 1958 (en cours d'impression).

## LE VIRUS DE L'AVORTEMENT DES OVINS. SENSIBILITÉ A QUELQUES ANTIBIOTIQUES

par F. ROGER et A. ROGER (\*).

(*Institut Pasteur, Service des Virus* [D<sup>r</sup> P. LÉPINE])

Les avortements infectieux constituent, sans contredit, un des problèmes majeurs de la pathologie ovine.

On a longtemps invoqué pour eux une étiologie strictement bactérienne, et c'est ainsi qu'on a insisté successivement sur le rôle des salmonelles, des brucelles et des vibrions.

Pourtant, dès 1950, Stamp, Mac Ewen, Watt et Nisbet [3] étaient frappés par l'absence de preuves bactériologiques évidentes au cours d'épidémies d'avortement, et s'engageaient aussitôt sur une voie nouvelle. A la suite d'investigations remarquables, ils réussissaient à isoler du placenta des animaux avortés un virus visible en microscopie ordinaire, appartenant de façon typique au grand groupe trachome-psittacose-lymphogranulomatose et qui s'avérait capable de reproduire expérimentalement la maladie.

Cette acquisition nouvelle obligeait à reconsidérer complètement les conceptions jusqu'alors classiques sur les avortements des ovins ; il fallut pourtant attendre 1955-1956 pour que cet effort soit entrepris dans notre pays. C'est, en effet, en 1955 que P. Faye au Laboratoire de la Fédération Nationale Ovine fut conduit à envisager l'étiologie virale de nombreux avortements dont les examens bactériologiques courants s'avéraient à nouveau impuissants à déterminer la cause.

Nous avons pu vérifier l'exactitude de cette hypothèse en 1956, au Service des Rickettsies de l'Institut Pasteur, où nous avons isolé et identifié un virus étiologiquement responsable, et absolument identique à celui qui avait été originellement décrit par les auteurs écossais [2].

Très rapidement, et malgré le peu de moyens dont nous avons disposé jusqu'ici, nous avons pu constater l'extrême fréquence apparente de ce virus dans notre pays. L'importance économique de l'infection paraît, en effet, loin d'être négligeable si l'on en juge par le nombre élevé d'avortements à virus que nous avons

(\*) Société Française de Microbiologie, séance du 4 décembre 1958.



pu déceler parmi les animaux avortés, examinés pour la plupart avec P. Faye. On ne peut donc que déplorer l'absence actuelle de recherches étiologiques systématiquement menées dans ce domaine selon des techniques virologiques correctes et éprouvées.

On ne saurait trop insister, en particulier, sur la nécessité de rechercher directement le virus dès l'apparition d'avortements dans les troupeaux, aussi bien chez les femelles avortées que chez celles qui ont paru mettre bas de façon normale : la mise en évidence directe du germe au niveau du placenta ou du col utérin est, en effet, très supérieure jusqu'ici aux techniques sérologiques parfois préconisées, mais dont la spécificité demeure encore par trop incertaine.

#### TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES.

Pour nos expériences, nous avons utilisé 3 souches principales :

- a) une souche écossaise de Mac Ewen,
- b) notre souche « Compiègne 56 »,
- c) la souche Faye-Simon isolée par le Dr Faye.

Nous nous sommes bornés à l'étude des antibiotiques facilement disponibles dans le commerce et susceptibles, par conséquent, d'être mis à la portée de tous ; c'est pourquoi nous avons seulement retenu : la pénicilline, la streptomycine, le chloramphénicol, la rovamycine et la tétracycline (cette dernière comme chef de file du groupe auréomycine, terramycine, tétracycline).

Dans nos essais, nous avons évité la technique des mélanges antibiotiques + virus, car elle conduit souvent à des erreurs sur l'activité réelle des produits examinés, en raison de phénomènes toxiques directs susceptibles de s'exercer sur le virus dans ces conditions (principalement du fait de pH parfois extrêmes). Nous avons toujours traité nos animaux par administration des antibiotiques à *distance* de la zone inoculée, ce qui ressemble d'ailleurs beaucoup aux exigences thérapeutiques au cours de la maladie naturelle. C'est aussi dans le but de nous rapprocher au maximum des impératifs vétérinaires que nous nous sommes efforcés de provoquer une maladie *locale* chez l'animal utilisé au laboratoire ; l'infection naturelle de la brebis est, en effet, essentiellement une *maladie locale* où le virus demeure très longtemps cantonné à l'intérieur de l'espace sanguin, interposé entre placenta maternel et placenta fœtal.

Ceci explique pourquoi nous avons employé des souris infectées par voie nasale et traitées par voie péritonéale ou par voie sous-cutanée.

Dans tous nos essais, la quantité de virus inoculée a toujours été considérable, puisqu'elle correspondait à 0,20 cm<sup>3</sup> d'une sus-

pension contenant l'ensemble des corps élémentaires d'une membrane vitelline extrêmement riche.

Cette dose a régulièrement tué les animaux témoins par asphyxie entre le 4<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> jour ; les poumons prélevés à cette date étaient augmentés de volume et massivement hépatisés ; ils contenaient une quantité énorme de corps élémentaires spécifiques, rapidement visibles sur frottis colorés au Macchiavello ou au Wright.

Nous n'avons jamais traité les animaux plus qu'une fois par vingt-quatre heures, toujours en vue de nous rapprocher des possibilités de traitement dans les élevages. Nous avons toutefois fait varier les modalités de traitement en jouant sur les doses utilisées et sur la date de la première injection d'antibiotique.

Lors des premiers essais, nous avons utilisé un schéma *prophylactique*, en inoculant le virus après administration des antibiotiques.

Ultérieurement, pour les produits qui s'étaient révélés doués d'une certaine activité préventive, nous avons entrepris leur étude selon un mode réellement *thérapeutique*, en remettant le début du traitement au 3<sup>e</sup> jour de la maladie, c'est-à-dire jusqu'au moment où les souris, gravement malades, présentent une dyspnée intense avec atteinte marquée de l'état général (poils hérissés, attitude en boule, anorexie complète, etc.).

Enfin, chaque fois que nous avons constaté une activité curatrice d'un produit, nous avons déterminé la dose minimum capable de guérir 100 p. 100 des animaux en quatre jours de traitement.

Dans tous nos essais, nous n'avons, en effet, jamais poursuivi le traitement pendant plus de quatre jours, afin que les résultats obtenus puissent être facilement transcrits dans les conditions pratiques de l'élevage, où une thérapeutique relativement coûteuse ne saurait être prolongée trop longtemps.

Pour chaque expérience, nous avons utilisé 8 souris par antibiotique et nous avons infecté simultanément un nombre égal de souris non traitées.

Nous avons répété deux à trois fois chaque essai et nous avons enfin groupé l'ensemble des substances étudiées dans une expérience terminale afin d'apprécier simultanément et comparativement leur activité dans des conditions absolument identiques.

#### RÉSULTATS.

Deux antibiotiques se sont montrés dépourvus de toute action sur le virus d'avortement : la *pénicilline* et la *streptomycine*.

Nous n'avons, en effet, jamais observé de ralentissement dans

la culture du virus ni aucune amélioration des symptômes ou de l'évolution de la maladie expérimentale, ni par l'utilisation séparée, ni par l'emploi simultané de ces deux antibiotiques. Et pourtant, nous avons eu recours à une posologie massive allant jusqu'à 1 000  $\mu$ g de streptomycine et 1 000 UO de pénicilline par jour pour une souris de 20 g.

Le *chloramphénicol* s'est montré simplement capable de ralentir la vitesse de multiplication du virus. Encore faut-il pour cela utiliser un schéma prophylactique (c'est-à-dire pratiquer l'inoculation sur des animaux déjà sous antibiotique) et recourir à des doses considérables, de l'ordre de 2 000  $\mu$ g par souris et par jour.

Dans ces conditions, la mortalité des animaux est nulle pendant le traitement. La maladie, pourtant, est constante : la dyspnée se manifeste et s'amplifie rapidement à partir de la 24<sup>e</sup> heure et le virus est constamment présent sur les frottis de poumons chez les animaux sacrifiés au 4<sup>e</sup> jour.

Si on laisse évoluer la maladie après le 4<sup>e</sup> jour, donc après l'arrêt du traitement, on observe chez ces animaux une affection pulmonaire traînante, parfois compliquée de surinfection bactérienne ou péripneumonique, avec atteinte constante de l'état général, mais où la mortalité demeure très irrégulière d'une expérience à l'autre.

La *tétracycline* et la *rovamycine* constituent en fait les antibiotiques électifs ; les deux substances sont, en effet, non seulement capables de prévenir l'infection, mais encore de guérir la pneumopathie du 3<sup>e</sup> jour, et même d'entraîner la stérilisation complète du virus.

Après traitement, on ne trouve plus de virus dans le poumon de l'animal, ni par examen direct de frottis pulmonaires, ni par passages en série dans le poumon de la souris ou dans l'œuf. Les poumons eux-mêmes sont macroscopiquement normaux.

Les doses 100 p. 100 actives sont de l'ordre de 1 000  $\mu$ g par animal et par jour (ce qui correspond à 2 g pour un mouton de 40 kg).

#### INCIDENCES PRATIQUES.

##### A. — UTILISATION DE L'ASSOCIATION PÉNICILLINE-STREPTOMYCINE AU LABORATOIRE.

Nous l'avons employée dans deux buts nettement distincts :

1<sup>o</sup> D'abord pour l'isolement des souches afin de nous débarrasser des bactéries si fréquentes dans les exsudats prélevés au niveau des placentas expulsés ou des écoulements purulents de la vulve ou du col utérin. Nous avons pu ainsi isoler de nombreuses souches en culture pure dans le poumon de la souris à partir

de matériel contaminé, grâce à un traitement systématique des animaux par voie sous-cutanée, une fois par jour pendant quatre à six jours, avec un mélange de 800 UO de pénicilline et 800 µg de streptomycine sous le volume de 0,2 cm<sup>3</sup>.

Les témoins non traités sont, au contraire, morts d'une broncho-pneumonie bactérienne massive dans la quasi-totalité des cas en deux à trois jours au cours des tentatives d'isolement.

2° *Adaptation à l'œuf des souches primitivement isolées dans le poumon de la souris* (1).

Il suffit de faire subir aux souris inoculées par voie nasale un traitement quotidien de 400 UO de pénicilline et 400 µg de streptomycine pendant les cinq jours qui suivent l'inoculation pour obtenir régulièrement une stérilisation pulmonaire et bronchique suffisante pour assurer l'absence complète de contamination bactérienne des œufs inoculés.

#### B. — UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES CHEZ LA BREBIS.

1° *L'association pénicilline-streptomycine* doit être réservée aux surinfections bactériennes, assez fréquentes d'ailleurs (mais rarement mortelles) après avortement à virus. On ne doit, au contraire, en attendre aucune activité sur le virus de l'avortement lui-même.

2° C'est donc seulement la *rovamycine* ou la *tétracycline* qu'on devra utiliser pour un traitement spécifique.

Deux modalités sont théoriquement possibles à ce sujet, soit un traitement continu poursuivi jusqu'à stérilisation complète de l'infection, soit un traitement discontinu ou moins prolongé, simplement destiné à contrôler le niveau final de culture.

On sait que la stérilisation des individus porteurs de virus est possible avec les virus du groupe TPL à condition de pratiquer un traitement suffisamment prolongé : un tel traitement peut cependant être fort onéreux lorsqu'il doit porter sur l'ensemble d'un troupeau.

*Le contrôle du niveau de culture du virus* par un traitement discontinu en courtes cures de trois à quatre jours par exemple, séparées par des intervalles libres plus ou moins prolongés, ne présente pas ces inconvénients d'ordre financier. Il nous semble aussi que ce traitement est biologiquement possible : nous avons montré, en effet, que l'avortement est un symptôme relativement tardif et assez inconstant de la maladie, faisant toujours suite à une longue évolution de l'infection (souvent même de l'ordre de plu-

(1) L'isolement direct dans le sac vitellin doit, en effet, être réservé aux seuls prélèvements réellement stériles du point de vue bactériologique (exsudats intra-utérins d'animaux sacrifiés avant avortement, dès apparition des premiers écoulements à la vulve).

seurs mois). Dans ces circonstances, un simple ralentissement du rythme de multiplication du virus doit permettre à la gestation de suivre un cours normal sans aucun dommage pour le fœtus qui naît. en règle générale, en dehors du circuit réel de l'infection.

Ce processus de culture contrôlée doit aussi permettre l'établissement d'une immunité durable puisque celle-ci fait toujours suite, dans les conditions naturelles, à la culture placentaire du virus.

Ce deuxième procédé est probablement le plus facile à utiliser, soit dans un but prophylactique, soit dans un but thérapeutique. D'après les premiers essais que nous avons faits, et pour lesquels nous avons préconisé la tétracycline, il paraît notamment susceptible de juguler les épidémies d'avortement à virus.

Il ne faut pas toutefois s'attendre à une activité spectaculaire des deux antibiotiques éfectifs *après apparition des premiers symptômes de l'avortement* : l'apparition de ces symptômes est, en effet, le résultat de lésions cotylédonnaires étendues et, par conséquent, difficilement réversibles : le traitement ne peut donc être ici qu'un traitement de groupe basé sur un diagnostic virologique précoce porté sur les premiers animaux avortés du troupeau.

#### RÉSUMÉ.

La tétracycline ou la rovamycine constituent expérimentalement les deux antibiotiques de choix du virus de l'avortement de la brebis.

La pénicilline et la streptomycine permettent seulement de combattre d'éventuelles surinfections.

Ces données ont un intérêt pratique au laboratoire pour les isollements dans le poumon de la souris ou pour l'adaptation seconde au sac vitellin.

Elles sont importantes surtout dans les conditions naturelles où l'association pénicilline-streptomycine doit être réservée aux seules complications bactériennes de l'avortement et où l'antibiothérapie spécifique relève soit de la rovamycine, soit de la tétracycline.

#### SUMMARY

THE VIRUS OF SHEEP ABORTION : SENSITIVITY TO CERTAIN ANTIBIOTICS.

Tetracyclin and spiramycin are the antibiotics of choice in experimental infection with sheep abortion virus.

Penicillin and streptomycin only allow the treatment of bacterial secondary infections.



These findings present a practical interest for laboratory isolations of the virus in mice lungs or for adaptation to the yolk sac. They have a particular importance in natural conditions: the combination penicillin + streptomycin must be used in cases of bacterial complications only, spiramycin and tetracyclin being the specific treatment of the virus infection.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] GIROUD (P.), ROGER (F.), VALLÉE (A.) et ROGER (A.). *Bull. Acad. Vét.*, 1956, **29**, 393-401.
  - [2] ROGER (F.) et ROGER (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 379-383.
  - [3] STAMP (J. T.), MAC EWEN (A. D.), WATT (J. A.) et NISBET (D. I.). *Vet. Rec.*, 1950, **62**, 251-254
-

# THE ACTION OF A LYTIC ENZYME FROM SPORES OF A *BACILLUS* ON VARIOUS SPECIES OF BACTERIA

by Elizabeth WORK (\*) (\*\*).

(*Institut Pasteur, Service de Physiologie Microbienne*)

Lytic enzymes are known to be associated with vegetative cells and spores of various species of bacillus (Greenberg and Halvarson [6], Nomura and Hosoda [8], Norris [9], Powell and Strange [11], Richmond [13], Strange and Dark [18, 19] Dark and Strange [5]. The enzyme from *Bacillus cereus* spores, studied by Strange and Dark [18] lyses isolated cell walls of this and other species of *Bacillus*, producing a mixture of soluble fragments of the mucopeptide moiety of the walls. Other types of bacteriolytic enzymes which have been studied in detail and are known to act on cell walls are lysozyme and the actinomycetins; they also yield soluble mucopeptide digestion products (Salton [14, 15], Salton and Guysen [16]. There are major differences in the reactive groups of the fragments produced by these three types of lytic enzymes (summarised Work [23]) indicating that different linkages in the substrate are split, but there is no doubt that the substrates are always the mucopeptide complexes which provide a rigid framework for the walls of Gram-positive bacteria (Cummins and Harris [4], Salton [15]).

Gram-negative bacteria are not normally susceptible to lysozyme, but if treated by alkali, heat, acetone, versene, polymixin or detergents they are rapidly lysed by the enzyme (Peterson and Hartsell [10]; Grula and Hartsell [7]; Warren, Gray and Bartell [20]; Repaske [12]; Warren, Gray and Yurchenco [21]; Colobert [2, 3]). Recent work by Salton [15] has indicated that the substrate in Gram-negative organisms is a part of the cell wall since, here too, mucopeptides are released from the walls by lysozyme. In these cases there is little visible lysis of the walls, probably because they contain lipoproteins as well as mucopeptide-polysaccharide complexes (Weidel and Promosigh [22]).

(\*) Medical Research Council Exchange Fellow.

(\*\*) Manuscrit reçu le 27 novembre 1958.

No data are available on the action of other types of lytic enzymes on Gram-negative organisms, but in view of the results with lysozyme, some effect might be expected. This paper (see also Work [24]) describes an investigation of the susceptibility of some Gram-positive and Gram-negative bacteria to lysis by an enzyme extracted from spores of a species of *Bacillus*.

#### METHODS.

**BACTERIA.** — *Bacillus* sp. 5832 from the collection of the Institut Pasteur was used for spore production. This is a *cereus*-like *Bacillus* (Schaeffer [17]) which had been rendered resistant to several antibiotics.

The following organisms were tested for lysis by spore enzyme: *Escherichia coli* B, grown on salts glucose (1 %) medium; *Salmonella typhimurium*, from Service de Physiologie Microbienne, Institut Pasteur, grown on salts glucose (1 %) medium; *Proteus vulgaris*, A. 244 Institut Pasteur Collection, grown broth; *Bacillus megaterium* 899, grown broth; *Staphylococcus aureus*, 53156 Institut Pasteur Collection, grown broth; *Micrococcus lysodeikticus* N. C. T. C. 2665, grown blood agar.

**GROWTH CONDITIONS.** — The sporulation medium was a glucose-peptone medium buffered with phosphate at pH 7.4. Salt medium was made up as follows (in g per litre):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 13.6; ammonium sulphate, 1.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.1;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.0005; pH adjusted to 7.2 with KOH. Glucose was sterilised separately.

All cells, with the exception of *Micrococcus lysodeikticus*, were grown at 37° in liquid shake cultures and were harvested in the exponential phase of growth. They were washed once with 0.9 % NaCl. Optical density was measured at 640 m $\mu$  in a Meunier electrophotometer; it was expressed in arbitrary units read from graduations of the drum.

**ACETONE DRYING.** — A thick suspension of cells in water or 0.9 % NaCl was poured into 20 vol. of acetone at 22°; after standing for 2 days at this temperature, the cells were collected by filtration, washed with acetone and dried *in vacuo* over silica gel.

**CHLOROFORM TREATMENT.** — A washed cell suspension was shaken gently for 3 min. at 22° with 2 drops of chloroform per ml; the cells were tested after standing for 0.5 to 1 hour at 22°.

**POLYMYXIN TREATMENT.** — This was carried out by the method of Warren, Gray and Yurchenco [21] in 1.0 M acetate buffer

pH 6.0, using 100  $\mu$ g polymixin per ml of suspension. After 30 min. at 2°, the cells were centrifuged and suspended in half-strength McIlvain buffer pH 7.6.

**VERSENE TREATMENT.** — The cell suspension in water was mixed with an equal volume of tetrasodium ethylenediamine tetraacetate [versene] (0.1 M adjusted to pH 7.7); after standing 5 min. at 22°, the cells were centrifuged, washed once with water and suspended in half-strength McIlvain buffer pH 7.6.

**DEOXYCHOLATE TREATMENT.** — Cells in half-strength McIlvain buffer pH 7.6 were treated with sodium deoxycholate (10 mg/ml) for 30 min. at 2° after which they were tested immediately.

**CELL WALLS.** — Were prepared by the method of Cummins and Harris [4]; their dinitrophenyl derivatives were made as described by Salton and Guysen [46].

**PREPARATION OF LYTIC ENZYME FROM SPORES.** — The method followed for the preparation of enzyme was based on that used by Strange and Dark [48] for extracting a lytic enzyme from *B. cereus* spores. *Bacillus* 5832 was grown at 37° for 22 hr with aeration in the sporulating medium (2.5 l); the resulting culture consisted almost entirely of free spores. The harvested spores were found to be mixed with a little phosphate which had precipitated from the medium during autoclaving; they were washed once with 0.9 % NaCl, suspended in water (65 ml, containing 35 mg dry wt/ml) and disintegrated in 7 ml portions for 45 min. at 2° with 4 g Ballotini in a Mickle disintegrator. The Ballotini were removed by filtration and washed with water, and the liquid was cleared by centrifugation at 2° at 3 000 r. p. m., the solid being washed with a small amount of water. The supernatant liquids were mixed with an equal volume of McIlvain buffer pH 3.0 at 2°, and centrifuged after 15 min. The precipitate was dissolved in 30 ml of McIlvain buffer pH 7.6 and tested for enzyme activity; it was further fractionated by ammonium sulphate after removal of nucleic acids by protamine precipitation. As no activity was found in any of the fractions, the materials were discarded. The supernatant liquid remaining at pH 3.0 was saturated with ammonium sulphate and the precipitate, which floated, was collected in a pipette as a suspension and was dialysed against running water. The dialysed solution was treated with 5 vol. of saturated ammonium sulphate, and the precipitate, after standing overnight at 2°, was separated by centrifuging at 10 000 r. p. m. It was dissolved in 15 ml of McIlvain buffer pH 7.6 and stored at -10°, under which conditions it was stable. It was diluted with 3 vol. of water before use.

**LYSIS TESTS.** — Unless otherwise stated, lysis was carried out at 22° in McIlvain citrate-phosphate buffer pH 8.0 (finally diluted approximately 2-fold) in 1 cm square tubes which were used directly for optical density measurements; the final volume was 1.0-1.2 ml. The appropriate volume of enzyme was mixed with 0.5 ml of buffer and 0.1 ml of cobalt chloride (2.5 mg/ml) and water if necessary; a control tube without enzyme was always included in each series of tests. The cell suspension (0.3-0.4 ml containing 0.5-0.6 mg dry wt) was added and the optical density measured immediately to obtain the starting value. Each tube was similarly treated successively at regular intervals (20-60 sec.) and thereafter optical densities were measured at regular time intervals. At the beginning of the work, acetone-dried cells were suspended in water; but this sometimes resulted in rapid unexplained lysis in the control tubes and the whole series had to be discarded. Cell suspensions in buffer were more stable, but were always used within an hour of mixing.

The results were calculated as percentage fall in optical density as a function of the initial value.

**GROWTH TESTS.** — The following solutions, sterilised by filtration through Chamberlain filters, were added to the glucose-salts media before inoculation with exponentially growing cultures. Bile salts; mixture of 0.5% sodium deoxycholate and 0.5% sodium taurocholate. Pancreatic enzyme; a solution was prepared from 1 g. Pancreatin Powder (L'Industrie Biologique Française) incubated 30 min at 37° in 10 ml of half strength McIlvain buffer pH 8.0, cleared by centrifugation and further diluted 4 times with water. Spore enzyme was sterilised and used without the usual dilution; boiled spore enzyme was heated for 10 min at 100°.

## RESULTS.

**PROPERTIES OF LYTIC ENZYME FROM SPORES.** — A temperature of 22° (room temperature) was found to be most suitable for measuring rates of lysis and was adopted for assay. The substrate first used was acetone-dried vegetative cells of *Bacillus* 5832, but as acetone-dried *E. coli* was found to be lysed faster, it was adopted as standard substrate.

Lytic activity was found only in the fraction of spore extract not precipitable at pH 3; 0.1 ml of this diluted enzyme preparation (equivalent to 4.8 mg dry wt of spores) produced maximal lysis of 1.0 ml *E. coli* suspension (containing 0.6 mg dry wt) at pH 8.0 in 6 min. Fig. 1 shows a series of lysis curves obtained with different amounts of enzyme, and fig. 2 gives the initial rates of lysis plotted against enzyme concentration. It can be seen that



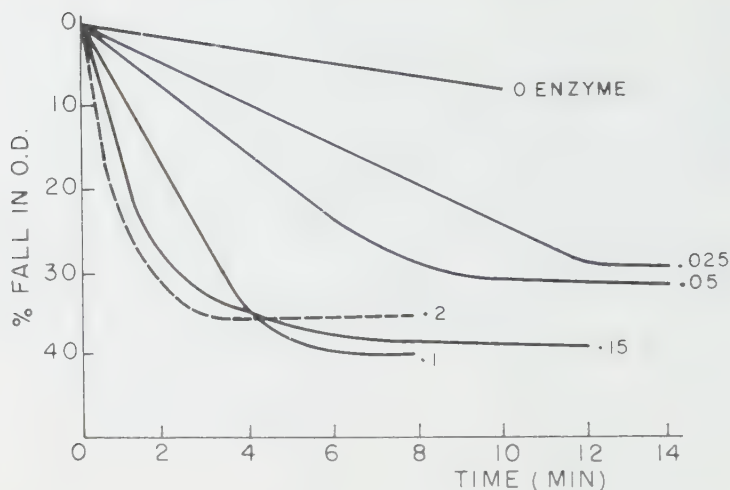


FIG. 1. — Effect of spore enzyme on optical density of suspensions of acetone-dried *E. coli*. Tubes contained 0.4 ml of 0.1 M tris buffer pH 8.0, 0.1 ml  $\text{CoCl}_2$  (2.5 mg/ml), spore enzyme in water to 0.7 ml. At time 0, 0.3 ml of suspension of acetone-dried *E. coli* in 0.05 M tris buffer pH 8.0 was added. Temperature 22°. Numbers against curves represent ml. of enzyme present.

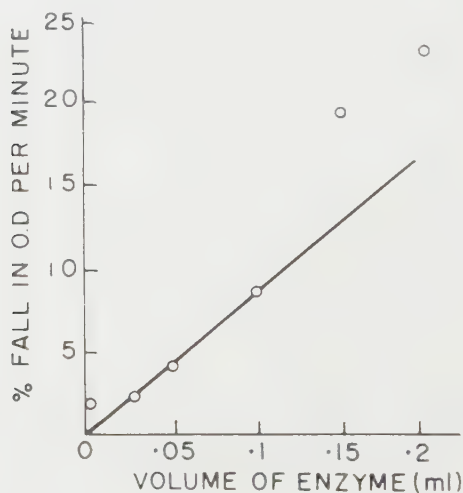


FIG. 2. — Relation between concentration of spore enzyme and rate of lysis of *E. coli* shown in fig. 1. Ordinates obtained from initial slopes of lysis curves.

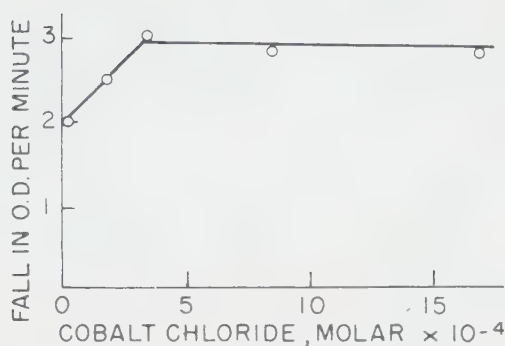


FIG. 3. — Effect of cobalt on lysis of acetone-dried *E. coli*. Tubes contained 0.4 ml of 0.1 M tris buffer pH 8.0, 0.05 ml of spore enzyme, varying amounts of cobalt chloride and water to 0.7 ml; 0.3 ml of cell suspension in 0.05 M tris buffer pH 8.0 was added at time 0. Temperature 22°.

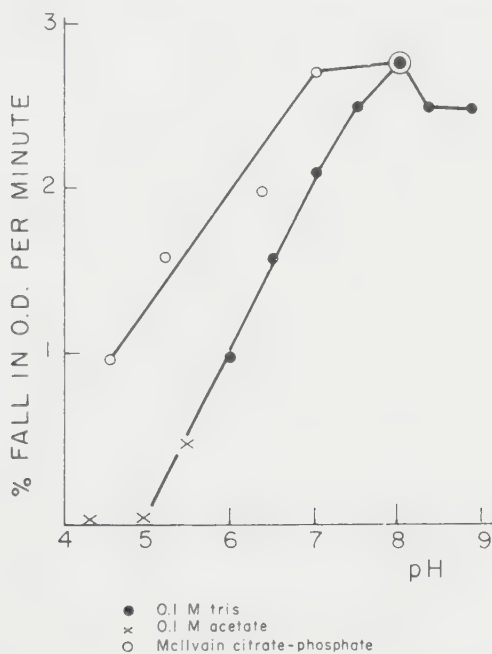
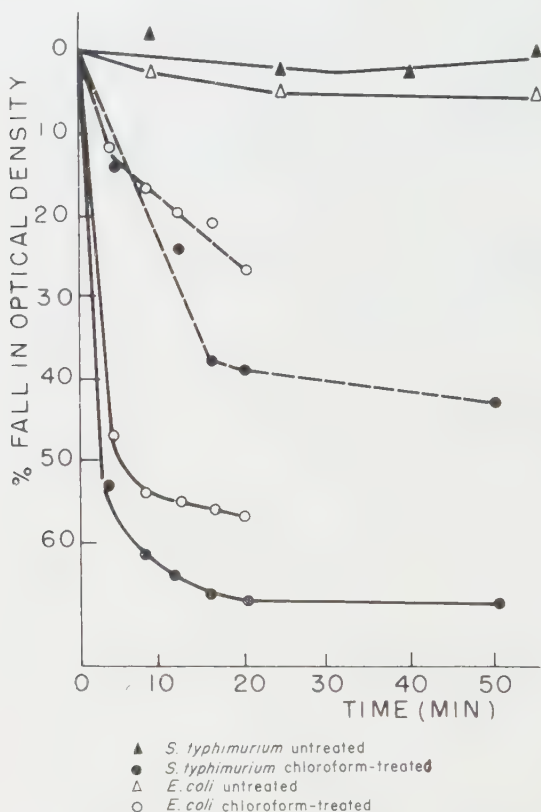


FIG. 4. — Effect of pH on activity of spore enzyme. Suspension (0.3 ml) of acetone-dried *E. coli* in 0.01 M McIlvain buffer pH 6.5 was added at time 0 to tubes containing 0.6 ml of buffer (indicated above) of appropriate pH, 0.1 ml  $\text{CoCl}_2$  (2.5 mg/ml) and 0.05 ml of spore enzyme. Temperature 22°.

at the lower concentrations of enzyme, the lysis rate was proportional to the amount of enzyme present; high concentrations of enzyme produced such rapid lysis that the initial rates could not be measured accurately.



— Enzyme present; ---- Control, without enzyme.

FIG. 5. — Effect of chloroform treatment on lysis of washed cell suspensions by spore enzyme. At time 0, cell suspensions, (0.4 ml) prepared as in methods, were added to 0.1 ml of spore enzyme in 0.6 ml of 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 and 0.1 ml  $\text{CoCl}_2$  (25 mg/ml). Temperature  $37^\circ$ .

The lysis rate was increased by addition of cobalt chloride (fig. 3). The relatively high rate in the absence of added cobalt is probably due to the presence of cobalt in the cell preparations. The pH optimum was about 8.0, when determined either in phosphate-citrate or tris buffer (fig. 4). The enzyme showed similar properties when tested against acetone-dried *S. typhimurium*.

Gram Stain	Organism	Treatment of cells after harvesting					
		None	Chloroform	Versene	Polymixin	Deoxycholate	Acetone drying
-	<i>Escherichia coli</i>	-	+++	+	+-	+	+++
-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	+++	+	+-	+-	+++
-	<i>Proteus vulgaris</i>	+-	+++		+-		+++
+	<i>Bacillus 5832</i>	+-	++				++
+	<i>Bacillus megaterium</i>	-	+		+-		+
+	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-			-	-
+	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	-	-	-			-

Cell suspensions, prepared as in methods, were incubated at pH 8.0 with cobalt chloride (10-3M) and spore enzyme. Optical density changes were compared with those of control suspensions with no enzyme. Results expressed as follow : — no lysis at 37° with 0.2 ml or more enzyme ; + — slow lysis at 37°, none at 22° with 0.1 ml enzyme ; + slow lysis at 22° with 0.1 ml enzyme ; + + rapid lysis at 22° with 0.1 ml enzyme ; + + + rapid lysis at 22° with 0.05 ml enzyme.

ACTION OF SPORE ENZYME ON VARIOUS SPECIES OF BACTERIA. — Fresh vegetative cells of *Bacillus* 5832 were lysed slowly by the spore enzyme; after acetone-drying or chloroform treatment, lysis was at least five times faster, but was slower than that obtained with *E. coli* similarly treated.

The enzyme had no activity, even at 37° in amounts 4 times greater than those normally used, against fresh cells of *E. coli* or *S. typhimurium*. After treatment with chloroform, the cells were lysed rapidly (fig. 5) provided they were tested more than half an hour after treatment; without this period of standing, *E. coli* was not lysed, and *S. typhimurium* was lysed at about half the final rate. The cells could also be made susceptible to the enzyme by treatment with versene, polymixin or deoxycholate, but lysis was always slower than after treatment with chloroform or acetone (see table, where results on all bacteria are summarised). Fresh *Proteus vulgaris* was lysed slowly by the enzyme, but the cells were much more susceptible after chloroform or acetone treatment; deoxycholate itself produced lysis of *Proteus* so could not be used for sensitisation. *B. megaterium* was not lysed until after treatment with chloroform, polymixin or acetone, and then it was not as susceptible as *Bacillus* 5832. *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus* were not lysed by spore enzyme under any conditions (a control experiment showed that the latter organism was very sensitive to lysozyme).

Thus, the three types of Gram-negative organisms investigated, when harvested during exponential growth, can by suitable treatments be rendered more susceptible to lysis by spore enzyme than similarly treated gram-positive cells. *E. coli* harvested after 24 hours was not susceptible.

ACTION OF SPORE ENZYME ON CELL WALLS. — Isolated cell walls of *B. megaterium* were lysed completely by the spore enzyme, but no visible effect was noted with walls of *E. coli*. After shaking the yellow dinitrophenyl derivative of walls of *E. coli* overnight at 37° with spore enzyme and 1 drop of chloroform, the resulting supernatant liquid was yellow and was found to contain a mixture of dialysable and non-dialysable yellow compounds.

Incubation of fresh versene-treated *E. coli* cells at pH 8.0 for 2-4 hours with spore enzyme and cobalt chloride ( $10^{-3}$  M) in the presence of various concentrations of sucrose between 5 % and 10 %, resulted in partial conversion of the cell suspension to circular forms which were unstable and burst, leaving square vacuolated bodies. Conditions for maintenance of stable circular forms were not investigated.



EFFECT OF SPORE ENZYME ON GROWING CELLS. — The growth of *E. coli* and *S. typhimurium* in various media was followed in the presence and absence of spore enzyme. In a normal glucose-salts medium, the enzyme had no effect on the growth rate when added at the time of inoculation (fig. 6 A) or 2 hours later; nor was the final optical density after 20 hours' incubation affected. When the pH of the medium was raised to 8 and kept

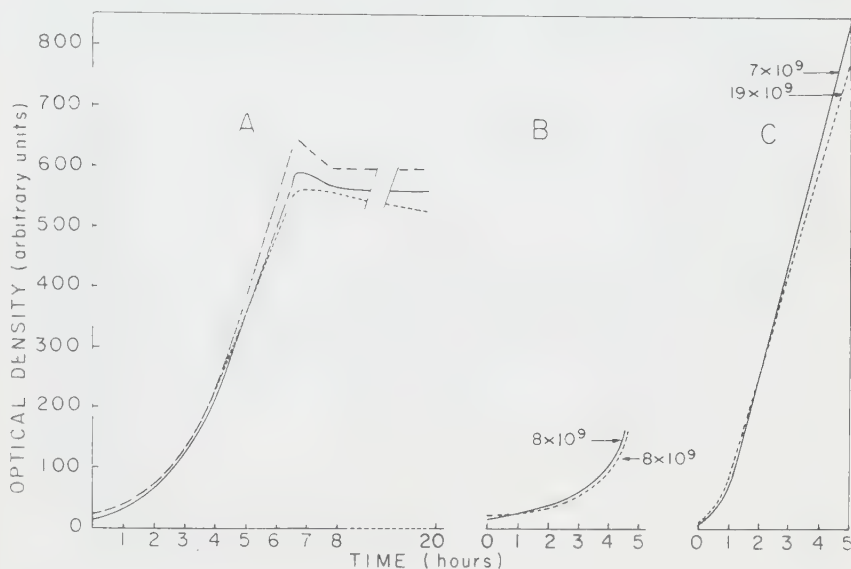


FIG. 6. — Effect of spore enzyme on growth of *S. typhimurium*. Cultures incubated with shaking at 37° in the following basal mixtures. A, Glucose (1 %) salts medium (pH 7.4), 4.0 ml; B, Glucose (0.25 %) salts medium (pH 8.0), 4.0 ml, + 0.6 ml water; C, Glucose (0.25 %) salts medium (pH 8.0), 4.0 ml, + 0.4 ml bile salts + 0.2 ml pancreatic enzymes. The lines indicate growth curves obtained after addition, immediately after inoculation, of 0.2 ml of the following : ——— Spore enzyme, ———— Boiled spore enzyme, - - - - - Water. The numbers against curves B and C indicate bacterial counts after 20 hr.

at this value throughout growth by lowering the glucose content, neither the initial growth rate nor the final bacterial count were affected by the presence of enzyme (fig. 6 B). At pH 8, added bile salts and pancreatic enzymes almost eliminated the lag phase and increased the growth rate, but did not cause the spore enzyme to have any effect (fig. 6 C).

Thus, it must be concluded that the spore enzyme has no effect on viability or growth rate of *E. coli* or *S. typhimurium*, whether they are growing slowly, fast or not at all, even in the presence of bile salts and pancreatic enzymes.

## DISCUSSION.

SPORES FROM ANOTHER *B. cereus* SPECIES.

This bacteriolytic enzyme obtained from spores of *Bacillus* sp. 5832 differed from that of *B. cereus* spores, which was described by Strange and Dark [18], in one major respect, namely solubility at pH 3.0. Other properties of the two enzymes were similar, for example they both had pH optima at 8.0. and were stimulated by cobalt; also they both attacked fresh vegetative cells of their own species but not of *B. megaterium*, although they lysed isolated walls of *B. megaterium*. Strange and Dark [19] have also described another lytic enzyme in *B. cereus* which was soluble at pH 3.0, but it had a pH optimum of 4.5 and was not activated by cobalt; it was found in autolysates from actively sporulating vegetative cells.

No comparison can be made of the relative activities of lytic enzymes from the two species of resting spores, owing to the different methods used for testing. Strange and Dark, using isolated *Bacillus cereus* walls (the true substrate for the enzyme), measured release of hexosamines or turbidity decrease at 56°. In the study reported here, fall in turbidity of acetone-dried cells at 22° was used as a criterion of lytic activity; this crude method was adopted as it was suitable for examining the activity of the spore enzyme against other species of bacteria. In view of the complicated natures of the substrate and of the effect measured, the observed proportionality between lysis rate and enzyme concentration was surprising and was utilised to examine some properties of the enzyme.

An unexpected finding was the high sensitivity to the enzyme of variously treated gram-negative bacteria; acetone-dried cells of *E. coli* were lysed faster than those of similarly treated *Bacillus* 5832. In general, the spore enzyme resembled lysozyme in its activity against gram-negative bacteria; fresh cells were not susceptible unless treated with a variety of agents, all of which have surface-active properties and probably act by damaging an outer protective lipid layer. Neither lysozyme (Salton [15]) nor spore enzyme produced appreciable turbidity changes in walls of *E. coli*, probably owing to the complex nature of the walls, but the release of coloured materials from dinitrophenol derivatives of walls of *E. coli* indicated that some peptide-containing component of the walls was solubilised. In the case of the gram-positive bacteria examined there were differences between susceptibilities to the two enzymes; only lysozyme attacked *Micrococcus lysodeikticus*, while *Bacillus* 5832, which is a *cereus*-like organism, was lysed by spore enzyme but not by lysozyme.

The effect of spore enzyme on growing gram-negative bacteria was studied in order to determine whether the enzyme could reach its substrate by penetrating the protective lipoprotein layer at the moment of cell division. Since bile salts had been found to sensitise resting cells to the enzyme, and since lipase may also have some effect on lipid membranes of gram-negative bacteria (Chaplin [4]), some of the cultures were grown in the presence of bile salts and mixed pancreatic enzymes. No effects of the spore enzyme were observed under any of the growth conditions used.

### SUMMARY

1. A bacteriolytic enzyme was prepared from spores of *Bacillus* sp. 5832 ; its lytic activity at pH 8.0 was tested against cells of various species of bacteria.

2. Washed fresh cell suspensions of *Bacillus* sp. 5832 or *Proteus vulgaris* were lysed slowly by the enzyme ; fresh *E. coli*, *S. typhimurium* and *B. megaterium* were not attacked. Certain preliminary treatments of all these organisms rendered them more susceptible to lysis ; either chloroform, acetone, versene, polymixin, or deoxycholate were effective. The enzyme had no action on *Staph. aureus* and *Micrococcus lysodeikticus* under any conditions.

3. The enzyme solubilised a peptide component of the walls of *E. coli*.

4. The enzyme had no effect on the growth rate of *E. coli* and *S. typhimurium* in glucose-salts media with or without added bile salts and pancreatic enzymes.

### RÉSUMÉ.

#### ACTION D'UN ENZYME LYTIQUE, ISOLÉ DES SPORES D'UN *Bacillus*, SUR DIFFÉRENTES ESPÈCES DE BACTÉRIES.

1° Un enzyme bactériolytique a été extrait de spores de *Bacillus* sp. 5832 ; son activité lytique a été étudiée, à pH 8,0, sur différentes espèces de bactéries.

2° Les suspensions fraîches de *Bacillus* sp. 5832 ou de *Proteus vulgaris* sont directement et lentement lysées par l'enzyme ; *E. coli*, *S. typhimurium* et *B. megaterium* ne sont pas lysés dans ces conditions. Toutefois un traitement préalable de toutes ces bactéries, soit par le chloroforme, soit par l'acétone, soit par le versène, soit par la polymyxine, soit par le désoxycholate de sodium les rend sensibles à l'action lytique de l'enzyme. L'enzyme est sans effet sur *Staph. aureus* ou *Micrococcus lysodeikticus* quelles que soient les conditions.

3° L'enzyme agit par solubilisation d'un des constituants peptidiques des parois cellulaires d'*E. coli*.

4° L'enzyme est sans influence sur la croissance d'*E. coli* ou de *S. typhimurium* en milieu synthétique additionné ou non de sels biliaires et d'enzymes pancréatiques.

## REFERENCES

- [1] CHAPLIN (C. E.). *J. Bact.*, 1952, **63**, 453.
  - [2] COLOBERT (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **245**, 1674.
  - [3] COLOBERT (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 156.
  - [4] CUMMINS (C. S.) and HARRIS (H.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 583.
  - [5] DARK (F. A.) and STRANGE (R. E.). *Nature*, 1957, **180**, 759.
  - [6] GREENBERG (R. A.) and HALVARSON (H. D.). *J. Bact.*, 1955, **69**, 45.
  - [7] GRULA (E. A.) and HARTSELL (S. E.). *Canad. J. Microbiol.*, 1957, **3**, 13 and 23.
  - [8] NOMURA (M.) and HOSODA (J.). *J. Bact.*, 1956, **72**, 573.
  - [9] NORRIS (J. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, 1.
  - [10] PETERSON (R. G.) and HARTSELL (S. E.). *J. inf. Dis.*, 1955, **96**, 75.
  - [11] POWELL (J. F.) and STRANGE (R. E.). *Biochem. J.*, 1956, **63**, 661.
  - [12] REPASKE (R.). *Biochim. biophys. Acta*, 1956, **22**, 189.
  - [13] RICHMOND (M. H.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, IV ; **18**, XII.
  - [14] SALTON (M. R. J.). *Biochim. biophys. Acta*, 1956, **22**, 495.
  - [15] SALTON (M. R. J.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 481.
  - [16] SALTON (M. R. J.) and GUYSSEN (J. M.). *Biochim. biophys. Acta*, 1957, **24**, 160.
  - [17] SCHAEFFER (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 624.
  - [18] STRANGE (R. E.) and DARK (F. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **16**, 236.
  - [19] STRANGE (R. E.) and DARK (F. A.). *J. gen. Microbiol.*, 1957, **17**, 525.
  - [20] WARREN (G. H.), GRAY (J.) and BARTELL (P.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 614.
  - [21] WARREN (G. H.), GRAY (J.) and YURCHENCO (J. A.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 788.
  - [22] WEIDEL (W.) and PRIMOSIGH (J.). *J. gen. Microbiol.*, 1958, **18**, 513.
  - [23] WORK (E.). *Nature*, 1957, **179**, 841.
  - [24] WORK (E.). *Proc. 4<sup>th</sup> Int. Congr. Biochem.*, Vienne, 1958, 129.
-

# SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15')

Séance du 5 février 1959.

Présidence de M. GIRARD.

---

## COMMUNICATIONS

### **ÉTUDE EXPÉRIMENTALE D'UNE BRUCELLE STREPTOMYCINO-DÉPENDANTE DÉRIVÉE DE LA SOUCHE B19 (SOUCHE OLITZKI)**

par H. JACOTOT et A. VALLÉE.

(avec la collaboration technique de A. LE PRIOL).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie Animale)

La brucelle qui a fait l'objet de cette étude nous a été aimablement remise par le professeur A. L. Olitzki de Jérusalem ; elle est entretenue sur gélose-tryptose additionnée de glycérine (3 p. 100) et de streptomycine (100 microgrammes au millilitre [1]).

**PARTICULARITÉ MORPHOBIOLOGIQUE.** — Jamais, au cours des nombreux repiquages que nous avons effectués cette brucelle ne s'est présentée autrement que sous la forme S ; il est vraisemblable que, l'adaptation progressive à la streptomycine ayant été pratiquée sur des bactéries exclusivement lisses, l'antibiotique joue maintenant le rôle d'inhibiteur de croissance vis-à-vis des mutants R, M ou mixtes.

**POUVOIR INFECTIEUX.** — Nous l'avons établi par appréciation de la bactériémie consécutive à l'inoculation sous-cutanée chez le cobaye, selon un protocole inspiré de celui que nous avons proposé antérieurement [2]. Chaque animal a reçu vingt milliards de microbes ; les prises de sang ont été pratiquées une heure, puis trois heures, six heures et



neuf heures après l'inoculation le premier jour, puis tous les jours pendant une semaine, puis une fois par semaine pendant six semaines ; après chaque saignée on portait 1 ml de sang sur gélose en tube de 22 et 1 ml en 25 ml de bouillon en ballon, ces milieux étant, bien entendu, additionnés de streptomycine. Pour compléter ces investigations, à deux reprises, après une semaine et après six semaines, des cobayes inoculés ont été sacrifiés et l'on a établi le poids proportionnel de leurs rates et la teneur de ces organes en brucelles (V. tableau I).

TABLEAU I. — Pouvoir infectieux pour le cobaye.

Prises de sang après															
1 h.	3 h.	6 h.	9 h.	1 j.	2 j.	3 j.	4 j.	5 j.	6 j.	1 s.	2 s.	3 s.	4 s.	5 s.	6 s.
●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/6	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
								<u>Après 1 semaine</u>				<u>Après 6 semaines</u>			
Pulpe splénique globale		Poids proportionnel						0.310				0.163			
		Teneur en microbes						de 50 à 500 au ml.				de 0 à 5 au ml.			

● : la brucelle a été retrouvée par hémoculture ; ○ : la brucelle n'a pas été retrouvée par hémoculture ; 2/2 : 2 cobayes sur 2 ont donné une hémoculture positive.

Ainsi la bactériémie qui, comme toujours, s'était établie très rapidement, dans la première heure, ne s'est pas prolongée au-delà du troisième jour ; ajoutons que la teneur du sang en brucelles a décliné régulièrement dans ces courts délais : après une heure, trois heures et six heures la gélose était entièrement recouverte, après neuf heures, aux trois quarts, après un jour, sur sa moitié ; après deux jours on comptait 20 colonies et après trois jours il n'y en avait plus qu'une. La régression de l'infection dans la pulpe splénique entre la première et la sixième semaine n'était pas moins significative. Le pouvoir infectieux de cette souche streptomycino-dépendante est beaucoup plus faible encore que celui de la souche vaccinale B 19 dont elle dérive, puisque cette dernière est parfois décelée dans le sang du cobaye pendant plusieurs semaines et se retrouve alors dans la pulpe splénique en quantité non négligeable ( $10^2$ ).

POUVOIR IMMUNIGÈNE POUR LE RAT BLANC. — Deux expériences ont été faites dans lesquelles on a fait usage d'une part, de suspensions de brucelles vivantes aux doses de 1 ml et de 0,25 ml, et, d'autre part, de suspensions de microbes tués par l'acide phénique, suspension diluée au 1/20, au 1/100 et au 1/1 000 ; ces suspensions contenaient, brutes, 10 milliards de microbes au millilitre l'une et l'autre. Dans des délais divers les rats vaccinés ont été éprouvés ou avec une souche de Br.

*abortus* ou avec une souche de *Br. melitensis*, chaque animal recevant, par voie péritonéale, 2 ml d'un mélange à parties égales de culture et de mucine au 1/20 selon la technique que nous employons [3]. Les résultats de ces deux expériences ont été groupés dans le tableau II.

TABLEAU II. — Pouvoir immunigène pour le rat blanc.

	Dose	Epreuve après				Témoins	
		7 semaines	3 mois 1/2	5 mois	7 mois	Abortus	Melitensis
		Résistant	Résistant	Résistant	Résistant	Meurent	Meurent
Vaccin vivant	1 ml	6/6		4/4		12/12	
			6/6		4/4		6/6
	0,25 ml	20/20					
		5/6		1/5		-id-	-id-
Vaccin tué	1/20						
				17/22			
		5/6		6/6		12/12	6/6
			4/4		1/2		
	1/100	16/18					
		4/6		3/4		-id-	-id-
			3/6		2/3		
		12/22					
	1/1000	4/5		2/5		-id-	-id-
			3/6		4/6		
	13/22						

De la lecture de ce tableau il se dégage que, dans le délai de sept mois sur lequel ont porté les épreuves échelonnées :

1° Tous les rats qui avaient reçu la suspension de microbes vivants ont résisté, à l'exception de quatre ;

2° 38 sur 44 des rats qui avaient reçu les dilutions au 1/20 ou au 1/100 de la suspension de microbes tués ont également résisté ainsi que 8 sur 23 de ceux qui en avaient reçu la dilution au 1/1 000.

Au surplus, dans les deux catégories de vaccinés, chez les sujets qui ont succombé à l'épreuve, la mort a été sensiblement retardée. En revanche, tous les témoins sont morts dans les courts délais habituels, la plupart dans les trente-six heures. Il est évident que cette souche de brucelle possède à l'égard du rat blanc un pouvoir immunigène bien caractérisé.

POUVOIR IMMUNIGÈNE POUR LE COBAYE. — 24 cobayes reçoivent par voie hypodermique le culot de centrifugation repris en bouillon gélosé à 2 p. 1 000 d'une culture en bouillon de la brucelle streptomycino-dépendante ; la dose injectée est de l'ordre de 5 milliards de microbes. Six semaines après, on éprouve ces animaux en même temps que

24 cobayes témoins, chacun recevant par voie hypodermique 1 milliard de brucelles pathogènes de type *melitensis*. Puis, chaque semaine pendant six semaines, on pratique des prises de sang pour hémocultures sur 4 animaux vaccinés et sur 4 témoins, selon le protocole indiqué plus haut pour l'étude de la bactériémie : des 24 hémocultures effectuées avec le sang de vaccinés, trois seulement sont positives et donnent sur gélose 1 ou 2 colonies ; au contraire, 17 sur 24 hémocultures des témoins sont positives et donnent sur gélose de 1 à 15 colonies. En fin d'expérience, la teneur en brucelles des rates du groupe témoin est cent fois plus élevée que celle des rates du groupe vacciné, leurs poids étant respectivement 0,33 et 0,28 p. 100 du poids du corps. La souche étudiée, additionnée d'un adjuvant, a conféré au cobaye une résistance appréciable vis-à-vis de l'infection brucellique.

CONCLUSION. — La souche de brucelle streptomycino-dépendante d'Olitzki, parfaitement sélectionnée dans le type S, se présente, par comparaison avec les souches vaccinales que la pratique a consacrées et notamment avec la souche B 19 dont elle dérive, comme douée, tout à la fois, d'un pouvoir pathogène extrêmement faible et d'un pouvoir immunigène très satisfaisant.

#### SUMMARY

EXPERIMENTAL STUDY OF A STREPTOMYCIN-DEPENDENT *Brucella* STRAIN DERIVED THE B19 (OLITZK) STRAIN.

The streptomycin-dependent *Brucella* strain isolated by Olitzki and always growing in S form, has been compared with the usual vaccine strain and particularly with the B19 strain from which it is derived.

It proves less pathogenic than the B19 strain and possesses a very satisfactory immunological capacity.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] OLITZKI (A. L.) et SZENBERG (E.). *Proceed. Soc. exp. Biol.*, 1953, **82**, 539.
  - [2] JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 121.
  - [3] JACOTOT (H.) et VALLÉE (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 152 et 1958 **94**, 372.
-

**SIX NOUVEAUX SÉROTYPES D'ARIZONA**  
**ISOLÉS DE REPTILES NORMAUX**  
**(16 : 33-25 ; 16 : 39-25 ; 29 : 33-40 ; 19 : 26 ;**  
**22 : 33-28 ; 30 : 27-28)**

par L. LE MINOR, P. R. EDWARDS, M. A. FIFE, L. CHAMBON  
et P. RAVISSE.

*Instituts Pasteur de Paris, Saigon, Brazzaville, et Communicable  
Disease Center, Public Health Service, U. S. Department of Health,  
Education, and Welfare, Atlanta, Georgia).*

Ces nouveaux sérotypes ont été isolés lors d'une enquête sur la présence des *Arizona* chez les reptiles normaux, au Viet-Nam et en A. E. F. Les caractères biochimiques correspondent à la définition des *Arizona* [4]. Nous n'avons pas rencontré pour ces souches d'anomalies majeures comme celles que nous avions signalées antérieurement [2] chez les *Arizona* isolées en France.

2905-58 (16 : 33-23). — Six cultures de ce sérotype ont été rencontrées à Saigon dans les coprocultures de 6 serpents (*Lapemis hardwickii*). Les antigènes O sont identiques à ceux de la souche standard du groupe O : 16 des *Arizona*. La phase 1 de l'antigène H est identique à celle de la souche standard H : 33 et la phase 2 à celle de la souche standard H : 25. L'antigène O est identique à l'antigène O : 38 des *Salmonella* et la phase 1 est étroitement apparentée avec l'antigène H : i des *Salmonella*.

1158-58 (16 : 39-25). — Deux cultures de ce sérotype ont été isolées de deux *Ancistrodon* à Saigon. L'antigène O est identique à celui de la souche standard d'*Arizona* du groupe O : 16. L'antigène H est diphasique. La phase 2, ainsi que le montre l'épreuve d'absorption, est identique à l'antigène H de la souche standard d'*Arizona* H : 25. Au contraire la phase 1 ne correspond à aucun des antigènes H actuellement connus. Un sérum préparé avec cette phase a un titre de 1/25 600 mais n'agglutine aucun des antigènes H connus d'*Arizona* et de *Salmonella* à 1/100. Ce nouvel antigène H est désigné par le symbole H : 39. Ce sérotype n'a de rapports antigénique avec les *Salmonella* que par son antigène O qui est identique au O : 38 de ce groupe.

2907-58 (29 : 33-40). — Ce sérotype est représenté par 6 cultures isolées de 6 reptiles (*Lapemis hardwickii*) à Saigon. L'antigène O est identique à celui de la culture standard d'*Arizona* O : 29. La phase 1 de l'antigène H est agglutinée au titre par le sérum *Arizona* H : 33 et dans l'épreuve d'absorption en sature toutes les agglutinines. La phase 2 est agglutinée seulement à 1/400 par le sérum *Arizona* H : 38 dont le titre

homologue est 1/20 000. Un sérum fut préparé avec la phase 2 de 2907-58. Son titre est de 1/10 000. Il n'agglutine l'antigène H : 37 *Arizona* qu'à 1/1 000 et l'antigène H : 38 qu'à 1/2 000. Ce nouvel antigène H est désigné par le symbole H : 40. La phase 1 de 2907-58 est étroitement apparentée avec l'antigène H : i des *Salmonella*. Les autres antigènes de ce sérotype n'ont pas de rapport avec les antigènes actuellement connus chez les *Salmonella*.

4678-58 (19 : 26). — Ce type est représenté par une seule culture isolée à Brazzaville par coproculture chez un serpent (*Thrasops flavigularis*). Agglutinée au titre homologue par le sérum O : 19 *Arizona*, cette culture en fait baisser le titre, lors de la saturation, de 1/1 000 à 1/50.

L'antigène H est identique à celui de la souche standard H : 26. Bien que cet antigène H : 26 n'ait été auparavant trouvé seulement que comme phase 1 de types diphasiques, aucune phase 2 ne put être trouvée chez ce sérotype malgré les essais répétés de culture en gélose molle additionnée de sérum H : 26. Cette souche ne possède pas de rapports antigéniques significatifs avec le groupe *Salmonella*.

4677-58 (22 : 33-28). — Ce sérotype est représenté par une seule culture isolée d'un serpent (*Causus rhombeatus*) à Brazzaville. Agglutinée au titre par le sérum *Arizona* O : 22, elle en sature totalement les agglutinines. La phase 1 de l'antigène H est agglutinée au titre par le sérum *Arizona* H : 33 et en sature toutes les agglutinines. La phase 2 est agglutinée au titre de tous les sérums H : 28 (28a 28b ; 28a 28c et 28a 28d). Ces antigènes H : 28 ont été caractérisés par Fey, Edwards et Stünzi (1957). Lors des épreuves d'absorption, la phase 2 de 4677-58 ne peut absorber complètement les agglutinines d'aucun de ces trois sérums. Elle est cependant plus proche de 28a-28b que des autres. Après absorption le titre du sérum 28a 28b est réduit de 1/20 000 à 1/500 et ce sérum saturé ne possède plus d'agglutinines pour 28a, 28c ni 28a, 28d.

L'antigène O de 4677-58 est étroitement apparenté à l'antigène O : 21 des *Salmonella*, tandis que les phases 1 et 2 de l'antigène H le sont respectivement avec les antigènes H : i et e, n des *Salmonella*.

3474-58 (3 : 27-28). — Ce sérotype est représenté par une culture isolée de serpent du genre *Dromophis* à Brazzaville. Elle est agglutinée au titre par le sérum *Arizona* O : 30. La saturation réduit ce titre de 1/10 240 à 1/640. Dans un but de simplification l'antigène O est simplement désigné par 30 et aucun sérum saturé ne fut préparé dans l'intention de subdiviser ce groupe O : 30. La phase 1 de l'antigène H est identique à celle de la culture standard H : 27 et la phase 2 à celle de la souche standard H : 28a 28b. La phase 1 est étroitement apparentée à l'antigène  $z_{10}$  des *Salmonella*, et la phase 2 à l'antigène e n de ce groupe.

RÉSUMÉ. — Six nouveaux sérotypes d'*Arizona* isolés de reptiles normaux à Saigon et Brazzaville sont décrits. Ces types sont représentés par les formules 16 : 33-25 ; 16 : 39-25 ; 29 : 33-40 ; 19 : 26 ; 22 : 33-28 ; 30 : 27-28. Les rapports antigéniques de ces types avec les *Salmonella* sont mentionnés et deux nouveaux antigènes H (H : 39 et H : 40) sont décrits.



## SUMMARY

Six new *Arizona* serotypes (16 : 33-25 ; 16 : 39-25 ; 29 : 33-40 ; 19 : 26 ; 27 : 33-28 ; 30 : 27-28) isolated from normal reptiles in Saigon and Brazzaville are described. The antigenic relationships of the serotypes to *Salmonella* are given and two new H antigens (H : 39 and H : 40) are described.

Nous remercions M<sup>lle</sup> Ch. Charié-Marsaines de sa collaboration technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1958, **8**, 25.  
[2] LE MINOR (L.), FIFE (M. A.) et EDWARDS (P. R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 326.  
[3] FEY (H.), EDWARDS (P. R.) et STÜNZI (H.). *Schweiz. Z. allg. Path.*, 1957, **20**, 27.

**SIX NOUVEAUX SÉROTYPES D'ARIZONA  
ISOLÉS DE SERPENTS EN ÉTHIOPIE  
(26 : 23-21 ; 26 : 32-21 ; 30 : 22-25 ; 16 : 22-31 ;  
24 : 22-25 ; 24 : 29-31)**

par M. A. FIFE, P. R. EDWARDS, L. LE MINOR et Ch. SÉRIÉ.

(Communicable Disease Center, Public Health Service, U. S. Department  
of Health, Education, and Welfare, Atlanta, Georgia,  
et Instituts Pasteur de Paris et d'Addis-Abeba.)

Ces six nouveaux sérotypes ont été isolés lors d'une étude sur la présence des *Arizona* chez les reptiles normaux. Les caractères biochimiques correspondaient à ceux de la définition des *Arizona* [1], sans présenter les anomalies que nous avons signalées chez certaines souches de France [2]. Nous décrirons successivement les six sérotypes.

251-58 (26 : 23-21). — Ce type est représenté par une seule culture isolée d'un *Echis carinatus*. Elle est agglutinée au titre homologue du sérum *Arizona* O : 26 et en sature totalement les agglutinines. La phase 1 de l'antigène H est agglutinée au titre du sérum *Arizona* H : 23. L'épreuve d'absorption en fait baisser le titre de 1/20 000 à 1/2 000. Nous n'avons pas préparé de sérum homologue saturé et cet antigène est simplement désigné comme H : 23. La phase 2 est agglutinée au titre par le sérum H : 21 et l'épreuve d'absorption sature toutes les agglutinines pour la souche homologue.

La phase 1 de ce sérotype a des facteurs communs avec l'antigène H : *k* des *Salmonella* et la phase 2 est en rapports étroits avec l'antigène H : *z* 35 des *Salmonella*.

261-58 (26 : 32-21). — Ce sérotype est représenté par deux cultures isolées de deux *Bitis arietans*. Agglutinées au titre du sérum *Arizona* O : 26, elles en saturent totalement les agglutinines. L'antigène H phase 1 est identique à celui de la culture standard d'*Arizona* H : 32 tandis que sa phase 2 est identique à l'antigène H de la souche standard H : 21. La phase 1 est en rapports étroits avec l'antigène H : *c* des *Salmonella*, la phase 2 avec l'antigène H : *z* 35 des *Salmonella*.

250-58 (30 : 22-25). — Ce sérotype est représenté par une culture isolée d'un *Bitis arietans*. L'antigène O, bien que voisin de celui de la souche standard O : 30 d'*Arizona* ne lui est pas strictement identique. La suspension O est agglutinée au titre du sérum, mais lors de l'épreuve d'absorption, celui-ci n'est réduit que de 1/10 240 à 1/320. L'antigène H phase 1 est identique à celui de la souche standard *Arizona* H : 32, l'antigène H phase 2 à celui de la souche standard H : 25. Seule la phase 1 qui a des relations partielles avec l'antigène *k* des *Salmonella*, aurait donc quelques rapports antigéniques avec les sérotypes connus des *Salmonella*.

2294-58 (16 : 22-31). — Ce type est représenté par 14 cultures isolées de 14 serpents *Dendraspis*. Agglutiné au titre du sérum *Arizona* O : 16, ce sérotype en sature toutes les agglutinines. L'antigène H est diphasique et les absorptions par les phases 1 et 2 ont montré leur identité respective avec les antigènes H : 22 et H : 31 des souches standard. L'antigène O est identique à l'antigène O : 38 des *Salmonella*. La phase 1 a quelques rapports partiels avec l'antigène H : *k* des *Salmonella* tandis que la phase 2 a des rapports étroits avec l'antigène H : *z* des *Salmonella*.

258-58 (24 : 22-25). — Une culture de ce sérotype a été isolée d'un *Echis carinatus*. Agglutiné au titre du sérum standard *Arizona* O : 24, ce sérotype en sature toutes les agglutinines. Les antigènes H phase 1 et 2 sont respectivement agglutinés au titre par les sérums H : 22 et H : 25, et en saturent toutes les agglutinines à l'épreuve d'absorption. Seule la phase 1 de l'antigène H de 252-58 a quelques rapports partiels avec l'antigène H : *k* des *Salmonella*. Il n'existe pas d'autres relation antigénique avec les sérotypes actuellement connus de *Salmonella*.

256-58 (24 : 29-31). — Quatre souches de ce sérotype ont été isolées chez quatre *Bitis arietans*. L'antigène O est identique à celui de la souche standard du groupe O : 24. La phase 1 de l'antigène H est agglutinée au titre par le sérum *Arizona* H : 29 et, dans l'épreuve d'absorption, fait baisser le titre homologue de 1/20 000 à 1/200. L'antigène H de la phase 2 est identique à celui de la souche standard H : 31. La phase 1 est en rapport avec l'antigène H : *k* des *Salmonella*, la phase 2 avec l'antigène *z*.

RÉSUMÉ. — Description de six nouveaux sérotypes d'*Arizona* (26 : 23-21 ; 26 : 32-21 ; 30 : 22-25 ; 16 : 22-31 ; 24 : 22-25 ; 24 : 29-31) isolés de serpents normaux en Ethiopie. Les rapports antigéniques de ces sérotypes avec les *Salmonella* sont rapportés.

## SUMMARY

Six new *Arizona* serotypes (26 : 23-21 ; 26 : 32-21 ; 30 : 22-25 ; 16 : 22-31 ; 24 : 22-25 ; 24 : 29-31) isolated from normal reptiles in Ethiopia are described. The antigenic relationships of the serotypes to *Salmonella* are given.

Nous remercions M<sup>lle</sup> Charié-Marsaines de sa collaboration technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] *Int. Bull. Bact. Nom. Tax.*, 1958, **8**, 25.  
[2] LE MINOR (L.), FIFE (M. A.) et EDWARDS (P. R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 326.

## RECHERCHE ET NUMÉRATION DES ENTÉROBACTÉRIES PAR HÉMOCULTURE SUR MEMBRANES FILTRANTES

par A. DODIN, E. R. BRYGOO et P. SUREAU.

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : Jean COURDURIER].)

Nous utilisons depuis quelques mois à l'Institut Pasteur de Madagascar la technique d'hémoculture signalée par Boy et Le Minor [1]. La mise en culture en milieu de Muller-Kauffmann du caillot sanguin nous a donné d'excellents résultats. Cette méthode permet une réponse particulièrement rapide. Nous nous réservons de revenir ultérieurement sur ses avantages.

Cependant, si la culture du caillot élimine partiellement les substances antibactériennes du sang, elle ne permet pas plus que l'hémoculture classique, de procéder à une numération des germes en circulation. La méthode de filtration sur membrane cellulosique, selon la technique mise au point par Buttiaux [2], nous rend de grands services pour les analyses d'eau. Nous avons cherché à appliquer aux hémocultures cette méthode de filtration dans le double but de dénombrer les germes présents dans le sang et d'éliminer le plus complètement possible les substances inhibitrices pouvant se trouver dans le plasma.

**MATÉRIEL.** — 1° Un appareil à filtration type *coli V* avec membranes correspondantes. 2° Un appareil à vide (pompe à vide, trompe à eau).

**MÉTHODE.** — Le sang recueilli à la veine est rejeté dans un tube à essai sur citrate de soude (0,4 ml d'une solution à 3,7 p. 100 pour 5 ml de sang). Avant la filtration, nous diluons le sang au 1/40 avec de l'eau physiologique.

L'appareil étant monté avec une membrane *coli V* et l'aspiration réglée à 25-30 cm de mercure, nous filtrons 10 ml de la dilution. Lorsque la membrane est sèche, elle se trouve couverte par une pellicule d'hématies qui gêne toute filtration ultérieure. On lyse alors par quelques gouttes d'eau distillée stérile les hématies. La membrane devient parfaitement claire. On peut à nouveau filtrer 10 ml de dilution. Les germes contenus dans 1/2 ml de sang ont été ainsi retenus par la membrane. Celle-ci est alors placée sur le milieu sélectif coulé en boîte de Petri de 80 mm. Nous filtrons dans les mêmes conditions sur une deuxième membrane le reste de la dilution, cette autre membrane étant placée sur un autre milieu sélectif.

Nous avons employé le milieu S. S.-Agar aux sels biliaires Difco n° 3 et le milieu de Kristensen au vert brillant, milieux auxquels nous avons ajouté 1 ml de solution aqueuse à 0,2 p. 100 de tergitol pour 20 ml de milieu au moment de la répartition en boîtes de Petri.

Placés à l'étuve à 37°, ces milieux permettent d'apercevoir les colonies sur membrane après dix-huit heures. Les milieux identiques, avec tergitol, utilisés sans membrane pour une culture directe ne révèlent leurs colonies qu'après trente-six à quarante-huit heures. Il faut vraisemblablement y voir l'action favorable sur la culture des résidus globulaires retenus sur la membrane.

Les colonies isolées sont alors repiquées en eau peptonée et permettent, six heures après, de procéder au diagnostic biochimique, déjà très orienté par l'allure des colonies sur S. S. et sur Kristensen.

RÉSULTATS. — Nous avons comparé les résultats de la filtration sur membrane avec ceux de la culture du caillot en Muller-Kauffmann.

Avec soixante hémocultures venant de Tananarive, nous avons obtenu les résultats suivants :

	<i>Salmonella</i>	<i>F. alcaligenes</i>	<i>Paracoli</i>
Sur membrane. . . . .	11	18	2
Caillot en M. K. . . . .	11	20	3

DISCUSSION. — Cette méthode nous a permis d'obtenir des résultats aussi précis que la technique de culture du caillot en milieu de Muller-Kauffmann, et aussi rapides. Mais cette méthode permet, de plus, la numération des germes contenus dans le sang circulant. Le nombre de colonies observées variait de 2 à 160 par millilitre de sang. Nous avons l'intention d'étudier ultérieurement l'importance de la bactériémie, en particulier dans le cas des fièvres typhoïdes en cours de traitement.

Un autre avantage de cette technique est l'utilisation d'une quantité minime de sang, ce qui permettrait avec un même prélèvement de procéder à des hémocultures sur différents milieux sélectifs. Dans ce cas, il conviendrait évidemment d'attacher le plus grand soin à la stérilité des manipulations.

RÉSUMÉ. — Nous proposons une technique d'hémoculture utilisant la méthode de filtration sur membrane. Cette technique donne des résultats particulièrement rapides. Elle permet la numération des germes présents dans le sang circulant.

## SUMMARY

ISOLATION AND ENUMERATION OF *Enterobacteriaceae* BY MEANS  
OF HEMOCULTURE ON FILTERING MEMBRANES.

A technique is described for hemoculture by means of filtration on a cellulose membrane. This technique yields very rapid results and allows the counting of the germs present in circulating blood.

Nous remercions le Dr Faucon et le Dr Bertrand qui nous ont fourni les prélèvements nécessaires aux hémocultures.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOY et LE MINOR. *Sem. Hôp.*, 1957, **402**, 3721.  
[2] BUTTIAUX (R.), MUCHEMBLÉ (G.) et LEURS (Th.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 1010.
- 

**IMMUNISATION DU NOURRISSON  
AVEC UN VACCIN TRIPLE ANTIDIPHTÉRIQUE,  
ANTITÉTANIQUE, ANTICOQUELUCHEUX ADSORBÉ**

par O. GIRARD, L. NICOL, J. CHEVÉ, G. AMOUREUX, J. ZOURBAS  
et Y. CARAES.

(*Institut Pasteur, Annexes de Garches et de La Roche-Beaulieu,  
Service de la Protection Maternelle et Infantile  
du Département de la Seine.*)

Dès 1950, Ramon, Lelong, Richou et Rossier [1] étudièrent en France la vaccination antidiphtérique chez le nourrisson de moins d'un an.

La même année, Debré et Zourbas [2] présentèrent les premiers résultats français de la vaccination antioqueleuse chez les nourrissons immunisés dès l'âge de deux mois à l'aide d'un vaccin D. T. C. américain.

Les étapes de l'étude de la vaccination antioqueleuse simple et associée, dans les crèches de la région parisienne, de 1947 à 1957, ont déjà fait l'objet de plusieurs publications [3, 4, 5, 6, 7] ; cet exposé sera donc limité aux résultats immunologiques de la vaccination triple chez le nourrisson.



Composition du vaccin adsorbé :

30 U. I. d'anatoxine diphtérique purifiée,

15 U. I. d'anatoxine tétanique purifiée,

25 milliards de bacilles coquelucheux (étalon U. S. A.) qui correspondent à 5 000 000 de germes numérables,

1 mg d'hydrate d'alumine (exprimé en  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) par millilitre.

Rythme des inoculations trois injections de 1 ml à quatre semaines d'intervalle, suivies d'une injection de rappel un an après la vaccination initiale.

Depuis octobre 1956, 552 nourrissons, dont 296 au cours du second semestre de la vie, ont pu être vaccinés dans 22 crèches du département de la Seine grâce à l'appui bienveillant de M. le Dr E. Lesné, médecin consultant régional de Pédiatrie, et de M. le Dr Leclainche, directeur général de l'Assistance Publique dont dépend le service de la Protection Maternelle et Infantile dirigé par le Dr F. Davidson que nous tenons à remercier bien sincèrement ici.

L'étude épidémiologique de la coqueluche dans le milieu des crèches a pu être faite dès 1947, car cette maladie représente une menace permanente pour les collectivités fortement et longuement contaminées par les non vaccinés.

De nombreuses observations épidémiologiques ayant la valeur d'une inoculation d'épreuve ont pu être faites [2, 3, 5, 6] et ont permis de prouver l'efficacité des vaccins adsorbés chez le nourrisson à partir de l'âge de 3 mois.

Depuis octobre 1956, les nourrissons vaccinés entre 6 et 12 mois avec le D. T. C. adsorbé utilisé pour ce travail ont été aussi bien protégés que ceux appartenant aux autres groupes précédemment étudiés.

Aucun cas de tétanos ni de diphtérie n'a été observé dans ces collectivités.

**TITRAGES.** — Des prélèvements de sang ont été pratiqués régulièrement et répétés le plus souvent possible (quatre à six fois pour certains enfants) à intervalle de deux à trois mois.

*192 titrages triples simultanés chez 121 nourrissons vaccinés entre 6 et 12 mois, et 167 titrages triples simultanés chez 115 nourrissons vaccinés après le douzième mois* ont permis l'étude comparative de deux groupes de vaccinés à des âges différents.

Le taux des antitoxines diphtérique et tétanique est exprimé en unités internationales (1).

Ces titrages ont été effectués *in vivo* par la méthode d'Ehrlich. Les agglutinines anticoquelucheuses ont été titrées *in vitro* par la méthode de Flodsdorff et Miller.

Le résultat de ces titrages est condensé dans le tableau I.

Dans la première colonne « Temps », figurent les délais séparant les injections vaccinales des titrages.

Dans la deuxième colonne « Age », les nourrissons sont classés en deux catégories : vaccinés entre 6 et 12 mois, vaccinés après 12 mois.

(1) L'unité internationale antitétanique définie en 1949 a une valeur double de l'unité définie antérieurement.

TABLEAU I. — Valeurs maxima, dominantes et minima des titres d'antitoxines diphtériques et tétaniques et d'agglutinines anti-coquelucheuses après vaccination des nourrissons des crèches parisiennes à l'aide d'un même vaccin D. T. C. purifié et adsorbé (lot n° 2281).

Temps	Age	Antitoxines Diphtériques			Antitoxines Tétaniques			Agglutinines Coquelucheuses			Nbre de titrages triples simulta-nés	Total des titrages triples simulta-nés.
		Max.	Dom.	Min.	Max.	Dom.	Min.	Max.	Dom.	Min.		
1 mois après 2 <sup>e</sup> avant 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	5	1/2	1/4	3	1/5	1/20	1/5120	1/640	1/80	22	
1 mois après 3 <sup>e</sup>	>12 mois	5	1/2	1/8	5	1/5	1/30	1/5120	1/640	1/80	25	47
1 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	5	1	1/2	5	1	1/5	1/5120	1/2560	1/640	49	
>12 mois		5	1	1/4	10	1	1/5	1/5120	1/1280	1/320	34	83
2 et 3 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	1	1/2	1/4	5	1/2	1/10	1/2560	1/640	1/160	24	
>12 mois		3	1/2	1/4	5	1/2	1/10	1/5120	1/640	1/160	27	51
4, 5, 6 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	1	1/2	1/4	1	1/5	1/30	1/2560	1/640	1/80	31	
>12 mois		3	1/2	1/8	1	1/5	1/50	1/2560	1/640	1/80	50	61
7, 8, 9 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	1	1/2	1/8	1/2	1/5	1/50	1/2560	1/320	1/20	26	
>12 mois		1	1/2	1/8	1/2	1/10	1/50	1/1280	1/320	1/20	19	45
10, 11 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	1	1/2	1/8	1/2	1/10	1/50	1/1280	1/320	1/20	25	
>12 mois		1	1/2	1/8	1/2	1/10	1/100	1/1280	1/320	1/20	20	43
1 mois après 3 <sup>e</sup>	6-12 mois	30	3	1	10	3	1	1/5120	1/1280	1/320	17	
>12 mois		30	3	1/2	10	3	1/2	1/5120	1/1280	1/320	12	29

Dans les colonnes suivantes, pour chaque groupe de vaccinés, les trois chiffres représentent respectivement les titres maximum (Max.), minimum (Min.) et les titres dominants (Dom.), c'est-à-dire ceux dont la fréquence est la plus grande.

De l'étude de ce tableau, nous pouvons tirer les constatations suivantes :

1° *Tous les enfants ont des titres d'anticorps satisfaisants.* — Les valeurs des titres d'antitoxine les plus basses ( $1/8$  d'unité pour la diphtérie,  $1/100$  pour le tétanos) sont supérieures aux valeurs conférant la protection ( $1/30$  d'unité pour la diphtérie,  $1/60$  d'unité internationale pour le tétanos (A. Lafaille [8])).

Le titre d'agglutinines anticoquelucheuses est presque toujours à  $1/320$  et dans tous les cas on décèle des anticorps agglutinants.

2° *On ne constate pas de différences importantes de la valeur des titres entre le groupe des nourrissons vaccinés du sixième au douzième mois, et le groupe de ceux qui ont été vaccinés après l'âge d'un an.*

3° L'étude chronologique de l'immunisation triple permet de noter :

a) Une protection solide est déjà obtenue après la deuxième injection ;

b) La troisième injection renforce et prolonge l'immunité, elle détermine un « pic d'hyperimmunisation » décrit ailleurs [3] ;

c) Une baisse progressive des titres s'observe dès le deuxième mois après la troisième injection, et le niveau le plus bas est observé entre le sixième et le onzième mois ;

d) L'injection de rappel provoque dès le cinquième jour un bond immunitaire se traduisant par des titres vingt à trente fois plus élevés. Cette augmentation est aussi notable chez le nourrisson que chez l'enfant plus âgé ;

e) La valeur dominante nous donne une idée assez fidèle des titres d'anticorps de la majorité des enfants, puisque celle-ci groupe de 70 à 80 p. 100 et parfois la quasi-totalité des valeurs des titrages effectués ;

f) Il existe un parallélisme constant entre la réaction immunitaire observée vis-à-vis des différents antigènes.

CONCLUSIONS. — La qualité des immunités étudiées chez 296 nourrissons vaccinés au cours du second semestre de la vie à l'aide d'un vaccin triple : antidiphtérique, antitétanique, anticoquelucheux (D. T. C.) purifié et adsorbé, est d'un niveau comparable à celui qu'on a obtenu au cours de précédentes études chez des enfants âgés de plus d'un an.

RÉSUMÉ. — Cent quatre-vingt-douze titrages triples simultanés de sérums prélevés chez 121 nourrissons âgés de 6 à 12 mois, vaccinés avec l'antigène triple antidiphtérique, antitétanique, anticoquelucheux, purifié et adsorbé, ont été effectués.

Cent soixante-sept autres titrages triples de sérums prélevés chez des nourrissons vaccinés après l'âge de 12 mois ont permis l'étude comparative de deux groupes de sujets inoculés à des âges différents avec le même vaccin.

On n'a pas pu relever de différences notables dans les valeurs des titres entre les groupes de nourrissons vaccinés entre 6 et 12 mois et ceux vaccinés après l'âge d'1 an.

Tous les enfants avaient des titres d'anticorps satisfaisants.

### SUMMARY

INFANTS VACCINATION WITH A TRIPLE ADSORBED ANTIDIPHTERIC, ANTITETANIC, ANTIPERTUSSIS VACCINE.

192 threefold simultaneous serum titrations from 121 infants, aged from 6 to 12 months, vaccinated with the triple purified and adsorbed antigen, antidiphtheric, antitetanic, antipertussis, were effectuated.

167 other threefold titrations of sera from infants vaccinated after the age of 12 months, have allowed the comparative study of two groups of children of different ages immunized with the same vaccine.

No noteworthy difference could be found between the titer of the group of infants vaccinated from 6 to 12 months and those vaccinated after the age of 12 months.

All the children had satisfactory antibody titers.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] RAMON (G.), LELONG (M.), RICHOU (R.) et ROSSIER (A.). *Rev. Immunol.*, 1950, **14**, 1.
  - [2] DEBRÉ (R.) et ZOURBAS (J.). *Arch. Franç. Pédiatrie*, 1951, **8**, n° 5.
  - [3] ZOURBAS (J.). *Séminaire sur la coqueluche*, Paris 16-décembre 1957, in *Rev. Immunol.*, 1958.
  - [4] CHEVÉ (J.), NICOL (L.), AMOUREUX (G.), GIRARD (O.) et ZOURBAS (J.). *III<sup>e</sup> Rencontre Internationale de Standardisation Biologique*, Opatija (Yougoslavie), 2-6 septembre 1957.
  - [5] LESNÉ (E.), LECLAINCHE (X.), DAVIDSON (M<sup>me</sup>) et ZOURBAS (J.). *Sem. Hôp.*, 6 décembre 1957, n° 44.
  - [6] LESNÉ (E.), MARIE (J.) et ZOURBAS (J.). *Médecine infantile*, mai 1958, n° 5, 49, et *Rev. Hyg.*, 1958, **6**, 793.
  - [7] ZOURBAS (J.). *Méd. Chir. pratiques*, septembre 1958, n° 2, 1111.
  - [8] LAFAILLE (A.), BONNEFOI (A.) et PARIS (C.). *Rev. Praticien*, 1958, **8**, 1417.
  - [9] DEBRÉ (R.). *Journées pédiatriques*, 1958, 227.
-

## QUELQUES REMARQUES A PROPOS D'UNE SOUCHE SOURIS-JEUNE LAPIN (de 3 à 4 MOIS) DE VIRUS APHTEUX DE TYPE C

par Giacinto CIACCIO et Paul GIROUD.

*(Laboratorio di Microbiologia e Chimioterapia Farmitalia, Milano  
[Dir. : Professeur A. DI MARCO],  
et Institut Pasteur de Paris [Service des Rickettsioses])*

Le lapin, qui a toujours servi dans l'expérimentation sur le virus aphteux, semble être l'animal de choix pour l'étude de ce virus. En effet, qu'il soit nouveau-né, jeune ou adulte, sa sensibilité offre de grandes ressources à l'expérimentateur.

A. LAPIN NOUVEAU-NÉ. — Les premières observations sur le lapin nouveau-né ont été faites par Nagel (1952) sur un petit nombre d'animaux, puis par Gribanow et ses collaborateurs (1954), Cunha et Eichhorn (1954) et Ciccio et Giroud (1954).

D'autre part, Arifjanow (1958) utilise une souche isolée de la brebis, l'adapte au lapin nouveau-né de 4 à 12 jours (le jeune lapin peut cultiver le virus jusqu'à quarante-cinq jours) et l'emploie après 150 passages pour vacciner avec succès le bovin. Cunha et Eichhorn (1954) réussirent à entretenir une souche de type O, passée sur souriceau, pendant 16 passages sur lapin nouveau-né. Cunha (1958) a gardé cette souche jusqu'au 138<sup>e</sup> passage. Au 111<sup>e</sup> passage, la souche était douée d'une légère virulence, mais elle protégeait les bovins vaccinés. Au 138<sup>e</sup> passage, la souche avait perdu sa virulence et provoquait chez les bovins une protection très faible. Ciccio et Giroud (1954) ont réussi à suivre pendant 6 passages une souche cobaye de type C adaptée au souriceau. Verge et coll. ont publié récemment (1957-1958) leurs essais portant :

1<sup>o</sup> Sur des cultures du virus de trois types (O, A, C).

2<sup>o</sup> Sur des essais de vaccination avec une souche de type O au 50<sup>e</sup> passage. Le broyat des muscles du lapin, seul ou associé à l'épithélium de la langue de vache normale, est utilisé comme antigène après adsorption sur alumine et traitement par le formol. Six animaux sur 8 se révèlent à l'épreuve vaccinés et les deux autres animaux font une fièvre aphteuse bénigne.

3<sup>o</sup> Une souche de type C est essayée pour la titrer sur bovin par inoculation dans la langue : au 50<sup>e</sup> passage, la souche est douée d'un pouvoir infectant remarquable, tandis qu'au 75<sup>e</sup> passage sa virulence est moindre ; quelques animaux ont présenté des lésions aphteuses très limitées au point d'inoculation, sans généralisation, et seuls deux animaux sur 15 ont eu de petits aphtes podaux.

4<sup>o</sup> Sur une étude sérologique faite par la réaction de fixation du



complément et la séroneutralisation avec une souche de type C, le virus « lapinisé » est un meilleur antigène que le virus d'origine cobaye ou bovine.

**B. LAPIN ADULTE.** — C'est en 1947 que Giroud et Jezierski réussirent à cultiver le virus aphteux, seul ou associé à des rickettsies, dans les sérosités artificiellement provoquées. En 1957, l'un de nous (Ciaccio) a essayé d'entretenir une souche cobaye de type C sur lapin pendant 6 passages. En prélevant le sang des lapins du deuxième au dix-huitième jour, il a pu isoler à nouveau et à maintes reprises le virus. Dans un essai avec la souche de type O, le virus a été isolé à nouveau trente-deux jours après l'inoculation.

Les recherches que nous rapportons ici se sont adressées au jeune lapin de 3 à 4 mois, situé entre le lapin nouveau-né qui est sensible et le lapin adulte résistant. On a utilisé une souche à caractères nouveaux du fait de son adaptation à la souris de 25 à 60 jours.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — 1° *Animaux.* — a) Deux jeunes lapins de 47 et 54 jours, apparemment sains, pesant 0,800 et 1,400 kg, et deux lapins adultes de 2,600-2.800 kg ; b) des souris de 22 à 30 jours, d'un même élevage, apparemment saines, ne présentant aucun symptôme d'ectromélie, c) des cobayes de 250 à 350 g.

2° *Voie et point d'inoculation.* — Les souris ont été injectées dans les muscles de la patte, les lapins dans les muscles de la région suscapulaire (le tissu adipeux de la région a peut-être été intéressé) et les cobayes dans le coussinet plantaire.

3° *Liquides utilisés pour le broyage des produits.* — a) Solution physiologique à pH 6,7 à 6,9 ; b) Solution tamponnée (selon McIlvaine) à pH 7 ; c) Eau du robinet, filtrée par Seitz EK, à pH 7,4, 7,6, 8,2.

4° *Doses.* — La souris et le cobaye reçoivent 0,20 ml de la suspension des muscles de lapin broyés en 4 ml. Le lapin reçoit 1 ml de la suspension des muscles et des os d'une patte entière de souris broyés en 1 ml de liquide.

5° *Conduite des essais.* — a) Les lapins ont été sacrifiés quarante-huit à soixante-douze heures après l'inoculation ; b) Les souris l'ont été en pleine évolution de la maladie ; c) Les cobayes ont été suivis pendant les phases de l'infection.

6° *Virus.* — On a employé une souche, adaptée à la souris de 25 à 60 jours, au 30<sup>e</sup> passage souris. La souche a été obtenue par l'inoculation à la souris d'une souche cobaye de type C au 793<sup>e</sup> passage.

**RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.** — La souris et le cobaye font une maladie caractéristique. Le lapin de 3 à 4 mois, au contraire, reste insensible à l'infection, sauf en des cas exceptionnels.

**COMPORTEMENT DE LA SOURIS ET DU COBAYE.** — La *souris* présente une succession de symptômes : tout d'abord au point d'inoculation, le virus provoque une paralysie très marquée dans les vingt-quatre à trente-six heures qui suivent l'inoculation, puis des paralysies apparaissent dans les pattes, le thorax, et la souris meurt après avoir présenté des troubles qui intéressent les appareils circulatoire et respiratoire.

Le *cobaye* réagit de différentes façons : a) de petits aphtes primaires (la scarification permet une localisation meilleure que l'inoculation intradermique) sont suivis d'aphtes secondaires ; b) des aphtes de la

langue et des pattes non inoculées (aphtes secondaires) ne sont pas précédés d'aphtes primaires ; c) après avoir présenté un aphte de la langue, une salivation abondante, le cobaye meurt sans aucun autre symptôme.

**COMPORTEMENT DU LAPIN.** — Sur 58 lapins de 3 à 4 mois, 6 ont présenté quelques symptômes : 2 lapins du 12<sup>e</sup> passage faisaient, à la soixante-douzième heure de l'inoculation, une légère paralysie de la patte au point d'inoculation ; 3 animaux du 18<sup>e</sup> passage étaient gênés dans les mouvements de la patte droite quarante-huit heures après l'injection dans la région suscapulaire droite et un lapin du 14<sup>e</sup> passage présentait, avant d'être sacrifié à la soixante-douzième heure, une dyspnée intense. Un seul animal (1/58), du 14<sup>e</sup> passage, est mort sans aucun symptôme quarante-huit heures après l'inoculation.

Une seule fois, on a testé sur souris, avant et après lyophilisation, le mélange du produit de 3 lapins. Le virus a pu être sorti à nouveau du produit lyophilisé. Sur 55 animaux testés individuellement sur souris, 2 seulement (2/55) n'ont provoqué aucun signe de maladie chez la souris et peuvent donc être considérés comme négatifs.

Le virus a été titré trois fois sur souris. Les titrages ont donné les valeurs de  $10^{-9}$  (lapin du 16<sup>e</sup> passage),  $10^{-2}$  (lapin du 17<sup>e</sup> passage),  $10^{-4}$  (2 lapins du 18<sup>e</sup> passage) et  $10^{-6}$  (un lapin du 18<sup>e</sup> passage) ; il a aussi été recherché dans des points éloignés du siège d'inoculation (patte postérieure gauche). Il n'a pas été récupéré dans les muscles inoculés (région suscapulaire) chez 2 lapins qui titraient respectivement  $10^{-2}$  et  $10^{-6}$  ; chez un troisième, du 16<sup>e</sup> passage, qui titrait  $10^{-9}$  au siège d'inoculation (région suscapulaire), on a isolé le virus du broyat non dilué ( $10^{-0}$ ) des muscles de la patte postérieure gauche, mais cet animal n'avait pas été saigné comme les deux autres avant l'autopsie et, dans ce cas, on ne peut exclure le pouvoir infectant du sang.

**ESSAIS SUR LAPINS DE MOINS DE 60 JOURS ET SUR LAPINS ADULTES.** — La souche souris-lapin du 15<sup>e</sup> passage a été essayée sur de jeunes lapins de 47 et 54 jours, tandis que la souche souris du 65<sup>e</sup> passage a été utilisée pour l'infection d'un lapin adulte.

**A. Lapins de 47 et 54 jours.** — Avec le matériel du 15<sup>e</sup> passage, on a inoculé un jeune lapin de 47 jours. L'animal fait une maladie caractérisée par des paralysies et de la dyspnée ; sacrifié à quarante-huit heures de l'inoculation, on prélève les muscles de la région suscapulaire droite, siège de l'inoculation, et on recherche le virus par le test sur la souris. Celle-ci fait une maladie typique. Un autre jeune lapin de 54 jours est inoculé directement avec le matériel du premier lapin ; il meurt à la soixante-douzième heure après avoir présenté une paralysie des pattes antérieures et une légère dyspnée. Avec le matériel de ce lapin des souris sont éprouvées : elles font une maladie typique et meurent à la quarante-huitième heure.

Dans cet essai, on a donc réussi à obtenir un 1<sup>er</sup> passage lapin-lapin.

**B. Lapins adultes.** — Deux lapins de 2,600-2,800 kg ont été utilisés. Le premier reçoit le virus sous forme du 65<sup>e</sup> passage de la souche souris. Il est sacrifié à la quarante-huitième heure sans avoir montré

aucun symptôme. Le matériel obtenu est testé sur souris qui, paralysées et mourantes à la trente-sixième heure, sont positives. On essaye de faire un passage direct sur un autre lapin, mais celui-ci, sacrifié à la quarante-huitième heure, est négatif au test sur la souris.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES. — D'après ces observations faites sur des lapins d'âge différent, on peut formuler l'hypothèse qu'avec certaines souches de virus aphteux, la réaction de l'animal n'est pas strictement liée à un âge défini. Il existe une phase de transition chez les animaux dans l'évolution d'une infection sous forme de maladie apparente (animaux jeunes) et de maladie inapparente (animaux plus âgés et adultes). La constatation expérimentale d'une maladie inapparente démontre toute son importance du fait que certains animaux peuvent permettre la multiplication silencieuse d'un virus ou garder le virus en respectant son pouvoir infectant.

CONCLUSION. — 1° Une souche de virus aphteux cobaye de type C, adaptée à la souris de 25 à 60 jours, a pu être entretenue pendant 20 passages alternés souris-lapin, par voie intramusculaire.

2° Le virus réisolé du lapin, titré sur souris, a donné des valeurs de  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  et  $10^{-9}$ .

3° Le lapin de 3 à 4 mois ne fait pas, généralement, une maladie apparente. Les lapins plus jeunes (47 à 54 jours) réagissent à l'infection en faisant une maladie semblable à celle bien connue des lapins nouveau-nés.

## SUMMARY

REMARKS ON A FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS TYPE C  
ADAPTED TO MICE AND SUBMITTED  
TO ALTERNATE TRANSFERS INTO MICE AND YOUNG RABBITS.

1. A strain of guinea pig foot-and-mouth disease virus type C adapted to 25-60 days old mice, has been maintained during 20 alternate intramuscular transfers into mice and rabbits.

2. The titers of the virus isolated from rabbits and assayed on mice were  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-9}$ .

3. The disease is generally not apparent in three to four month's old rabbits. In young experimentally infected animals (47-54 days old) it follows the same course as in newborn rabbits.

## BIBLIOGRAPHIE

- GIROUD (P.) et JEZIERSKI (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1180.  
 NAGEL (H. C.). *Gaceta Veter.*, 1952, **14**, 52.  
 CUNHA (R. C.) et EICHORN (H. A.). *Am. J. Vet. Res.*, 1954, **15**, 149.  
 CIACCIO (G.) et GIROUD (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1954, **148**, 1975.  
 CIACCIO (G.). *Rev. Immunol.*, 1957, **21**, 285.  
 VERGE (J.), PARAF (F.), DHENNIN (Louis), DHENNIN (Léone) et ASSO (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1957, **244**, 3098.  
 VERGE (J.), PARAF (A.), DHENNIN (Louis), DHENNIN (Léone) et ASSO (J.). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1958, **49**, 93.  
 PARAF (A.), ASSO (J.) et VERGE (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 3698.

## ESSAI DE NEUTRALISATION DU VIRUS DE NEWCASTLE PAR LE SÉRUM DE LAPIN ET LE LAIT DE VACHE

par Giacinto CIACCIO.

(Présenté par M. GIROUD.)

(*Laboratorio di Microbiologia e Chimioterapia, Farmitalia, Milano*  
[Dir. : Professeur A. DI MARCO])

INTRODUCTION. — Au cours des essais d'infection de la souris par le virus Columbia-SK, on a pu constater (Ciaccio, 1957) que des sérums de bovin et le lait de vache pouvaient montrer un pouvoir neutralisant vis-à-vis de ce virus. Ces observations méritaient d'être confirmées sur d'autres virus.

Nous nous sommes adressé au virus de Newcastle. Sur ce virus, au cours d'essais de neutralisation avec les sérums de divers animaux et de l'homme, des constatations ont été faites par de nombreux auteurs (Ginsberg et Wedgwood ; Karzon ; Ginsberg et Pillemer, etc.) Par ailleurs, Ginsberg et Wedgwood (1956) et Wedgwood, Ginsberg et Pillemer (1956) ont étudié l'inactivation du virus de Newcastle par la propérine.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE. — 1° *Virus*. — Nous avons utilisé deux souches ayant subi respectivement 119 et 25 passages sur l'embryon de poulet.

2° *Test de neutralisation*. — Les dilutions du virus ont été préparées avec le produit à tester : sérum de lapin ou lait de vache. Après vingt à trente minutes de contact à la température du laboratoire, des groupes d'embryons de poulet sont inoculés par voie chorio-allantoïdienne avec une dose constante de 0,20 ml de chaque dilution.

3° *Recherche du virus*. — Par le test d'hémagglutination, on a recherché le virus chez les embryons morts aux vingt-quatrième, quarante-huitième et quatre-vingt-seizième heures et chez ceux sacrifiés à la cent vingtième heure après l'inoculation.

4° *Produits*. — a) *Sérum de lapin*. Les sérums, prélevés chez des animaux apparemment sains, ont été utilisés après filtration par Seitz EK, de deux à cinq jours après la récolte, mais en ayant soin de les conserver à 3° C. Les sérums n'ont pas été inactivés par chauffage à 56° C pendant trente minutes. Dans un seul essai, le même sérum a été testé frais et après inactivation. Les valeurs du pH des sérums étaient de 7,6-7,8. b) *Lait de vache*. On a utilisé des échantillons de lait frais, de lait conservé à 3° C et de lait pasteurisé (trente minutes à 63° C), sous forme de lait entier ou de sérum. La plus grande partie des graisses ayant été enlevée, le lait est filtré sur papier, sur filtre en verre G.5 et sur Seitz EK. Ces préparations ont été faites à la température du laboratoire (28-30° C en été, 22-24° C en hiver et au printemps), dans les plus brefs délais possibles. Le sérum du lait a été obtenu après l'action de la présure à 37° C. Le sérum

a été filtré sur papier, sur filtre en verre G.5 et sur Seitz EK. Les valeurs du pH du lait ont été de 6,5-7. Pour le sérum, le pH était aussi de 6,5-7 lorsque la présure agissait pendant deux ou trois heures, mais dans le cas d'un traitement prolongé, douze à dix-huit heures, les valeurs du pH étaient de 4,8-5.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. — 1° *Lait de vache*. — Au cours de 12 essais, on n'a pas réussi à mettre en évidence un pouvoir neutralisant vis-à-vis du virus de Newcastle.

2° *Sérum de lapin*. — Les résultats de 9 essais ont été constants et concordants. Quelques-uns de ces essais, choisis parmi les plus typiques, sont rapportés sur le tableau I.

TABLEAU I.

pro- duit	pH	Dilution du virus										
		10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-7,3</sup>	10 <sup>-7,6</sup>	10 <sup>-7,9</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>	10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-11,3</sup>
Sph.	7,3	5/5(+)	5/5	5/5	5/5	5/5						
Lap. 1	7,6	4/5	4/5	2/5	1/5	0/5						
Lap. 2	7/5	2/5	2/5	1/4	1/5	2/5						
Sph.	7	4/5	3/5	4/5				5/5	5/5	5/5		
Lap. 3	7,5	4/5	4/5	2/5				2/5	0/5	1/5		
Sph.	7,4			4/6				6/6	6/6	6/6	6/6	3/6
Lap. 4	7,8			2/8				0/8	1/8	0/8	0/8	0/8
Sph.	7,4			8/8				8/8	7/8	7/8	8/8	7/8
Lap. 5	7,8			4/8				6/8	2/8	2/8	2/8	0/8
Lap. 5	7,9			8/8				7/8	8/8	6/8	6/8	8/8
30 m. à 56°C.												
Sph.	7,3			6/6				5/6	4/6	5/6	5/6	5/6
Lap. 6	7,8			5/6				3/6	2/6	2/5	3/6	2/6

Sph. : solution physiologique ; Lap. : lapin ; m. minutes ; (\*) numérateur : embryons positifs ; dénominateur : embryons inoculés.

Une activité antivirale du sérum frais de lapin apparemment sain est constatée, tandis que le chauffage du même sérum pendant trente minutes à 56° C détruit ce pouvoir.

Les résultats de ces essais confirment les constatations faites par les auteurs américains.

CONCLUSIONS. — 1° Un pouvoir antiviral est constaté dans le sérum frais du lapin apparemment sain, vis-à-vis du virus de Newcastle. Le chauffage du sérum à 56° C, pendant trente minutes, détruit ce pouvoir antiviral.

2° Dans le lait de vache, on n'a pu déceler aucune activité antivirale vis-à-vis du virus de Newcastle. Le lait de vache et ses produits sont donc inactifs vis-à-vis de ce virus.



## SUMMARY

ATTEMPTS TO NEUTRALIZE THE NEWCASTLE DISEASE VIRUS  
BY RABBIT SERUM AND COW MILK.

1. Fresh normal rabbit serum possesses a neutralizing capacity towards NDV. Heating at 56° during 30 minutes destroys this antiviral property.

2. In cow milk it has not been possible to demonstrate any activity against NDV.

## BIBLIOGRAPHIE

- CIACCO (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 844.  
 CIACCO (G.). *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 37.  
 PILLEMER (L.). *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1956, **66**, 223.  
 GINSBERG (H. S.) et WEDGWOOD (R. J.). *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1956, **66**, 251.  
 WEDGWOOD (R. J.), GINSBERG (H. S.) et PILLEMER (L.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 707.

# TRANSDUCTION PHAGIQUE DE LA SPOROGENÈSE CHEZ *B. ANTHRACIS*

par N. STAMATIN.

(Présenté par M. JACOTOT.)

(Laboratoire de Microbiologie  
de la Faculté de Médecine Vétérinaire, Bucarest)

On peut obtenir des variantes asporogènes de *B. anthracis* en partant des colonies filles développées à la surface des colonies primaires sporogènes, ainsi qu'il résulte de recherches déjà anciennes faites par Preisz (1904), par Bordet et Renaux (1930) et par nous-même (1934, 1935). Nous avons montré à plusieurs reprises que les colonies filles sont le résultat d'un autre mode de multiplication que la division directe, peut-être le résultat d'une conjugaison, et en désaccord avec Preisz, Bordet et Renaux, nous avons affirmé qu'il n'y a aucune relation entre la sporogénité et la formation des colonies filles. Ce type de colonies peut d'ailleurs apparaître aussi bien chez les souches asporogènes de *B. anthracis* que dans des espèces normalement dépourvues de spores, *E. coli*, par exemple. Les variantes asporogènes de *B. anthracis*, ainsi que nous nous en sommes convaincu au cours de nombreuses recherches, sont stables, c'est-à-dire qu'elles ne font pas retour à la forme sporulée. L'aptitude à la sporogenèse paraît chez elles définitivement perdue.

Des recherches récentes ont démontré que le bactériophage peut

entraîner des facteurs de l'hérédité et, en les transférant à des cellules bactériennes nouvelles, y provoquer certaines modifications affectant surtout les propriétés fermentatives (Lederberg, 1957). En ce qui concerne *B. anthracis*, Brown et coll. (1955) ont affirmé avoir obtenu des variantes mobiles de ce germe par action d'un phage entretenu au préalable sur une souche mobile de *B. cereus*, mais ces résultats ne furent confirmés ni par Sterne et Proom (1957), ni par Ivanovic et Foldes (1958).

En partant de ces recherches nous avons essayé d'induire, au moyen d'un bactériophage spécifique, chez des souches asporogènes de *B. anthracis*, la propriété perdue, c'est-à-dire la sporogénèse, et quelquefois, comme nous allons le montrer, nous avons réussi.

**MATÉRIEL ET TECHNIQUE.** — Nous avons utilisé, au cours de nos recherches, plusieurs souches de *B. anthracis* récemment isolées d'animaux morts de charbon et qui étaient virulentes et sporogènes. De ces souches nous avons isolé, par la technique des colonies filles, des variantes asporogènes. Le contrôle de l'asporogénèse était fait microscopiquement, mais la preuve décisive était apportée par chauffage à la température de 65-70° pendant dix à quinze minutes ; nous considérons qu'une variante était asporogène lorsque la suspension d'une culture sur gélose était stérilisée par un tel chauffage.

Pour induire la sporogénèse chez une souche asporogène, nous avons utilisé le phage E isolé du sol par Stamatin et Li Van Sob (1958) et qui possède une haute spécificité d'action (Ciuca et coll.). Le phage était passé d'abord sur une souche sporogène (souche n° 1937 peu sensible au phage). Dans ce but onensemait la souche sporogène et le phage dans du bouillon et sur gélose ordinaires. Après vingt-quatre heures de contact, on lavait la culture sur gélose, et la suspension ainsi obtenue ainsi que la culture en bouillon étaient passées sur filtre Seitz. Le filtrat était rigoureusement contrôlé quant à sa stérilité, et on le portait sur des variantes asporogènes. Dans ce but, onensemait la souche asporogène sur toute la surface de la gélose inclinée et ensuite on versait II à III gouttes de filtrat sur la partie inférieure de la surface du milieu. Onensemait toujours des tubes de gélose témoins avec la même souche asporogène de *B. anthracis*, mais sans y ajouter le phage. Le phage lui-même était ensemencé parallèlement sur quelques tubes de gélose pour vérifier encore une fois qu'il ne contenait pas de spores de *B. anthracis*.

Les souches asporogènes étant sensibles au phage, dans les zones soumises à son action et d'abord stériles, se développaient, à partir de quarante-huit à soixante-douze heures à la température du laboratoire, des colonies isolées constituées par des bacilles résistants. Les cultures soumises à l'action du phage, ainsi que les cultures témoins, étaient conservées à la température du laboratoire. Dix à douze jours après l'ensemencement, on introduisait du bouillon stérile en quantité suffisante pour couvrir toute la surface ensemencée de la gélose. Puis tous les tubes étaient chauffés pendant dix à quinze minutes à 65-70°. Les cultures ainsi chauffées étaient conservées encore deux à trois jours à 37° pour permettre éventuellement la germination des spores. Lorsqu'elles contenaient des spores une culture de *B. anthracis* se

développait dans le bouillon. Dans les cas positifs, on pratiquait des repiquages sur gélose et la souche isolée était étudiée quant à sa capacité à former des spores et son pouvoir pathogène pour la souris.

TABLEAU I. -- Expériences concernant l'induction de la sporogénèse chez quelques souches asporogènes de *B. anthracis*.

Souches asporogènes	Date de l'isolement	Matériel ensemencé sur gélose	1 <sup>e</sup>	Chauffé à 65-70° 1 <sup>e</sup>	Résultat
1398	mai 1957	Culture	12.11.57	24.11.57	Stérile
		Culture + phage	"	"	Stérile
1886	août 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	<i>B. anthracis</i> sporogène & virulent
1891	sept. 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	<i>B. anthracis</i> sporogène & virulent
1897 A <sub>1</sub>	août 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	Stérile
1936	oct. 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	<i>B. anthracis</i> sporogène & virulent
1897 A <sub>2</sub>	août 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	Stérile
1892	août 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	<i>B. anthracis</i> sporogène & virulent
1898	août 1958	Culture	"	"	Stérile
		Culture + phage	"	"	<i>B. anthracis</i> sporogène & virulent

En procédant de cette manière, nous avons réussi plusieurs fois à induire la sporogénèse chez des souches asporogènes. En effet, assez souvent, les cultures contenant, avec *B. anthracis* asporogène, le phage spécifique n'étaient pas stérilisées par le chauffage, comme on peut le voir dans le tableau I, tandis que les témoins (culture asporogène sans phage) étaient stérilisés. De plus, des tubes contenant culture et phage on isolait des souches sporogènes constamment résistantes à la chaleur. Ces souches appartiennent bien à l'espèce *B. anthracis* ; elles tuent la souris et dans le sang du cadavre on trouve de nombreux bacilles capsulés.

CONCLUSIONS. — 1° En utilisant le phage spécifique E, nous avons réussi à induire la sporogénèse chez plusieurs souches asporogènes de *B. anthracis*, surtout chez des souches récemment isolées. Nous n'avons jamais réussi à induire la sporogénèse chez des souches asporogènes isolées et entretenues dans le laboratoire depuis plus d'un an. D'ailleurs, même les souches asporogènes récemment isolées se comportent inégalement ; les unes, comme la souche 1891, réagissent promptement au phage par la production de germes sporogènes, tandis que d'autres ne sont pas influencées par lui.

2° On peut admettre qu'en se multipliant sur des germes sporogènes, donc porteurs du facteur de la sporogénèse, le phage se charge de ce facteur et qu'il le transfère ensuite aux germes asporogènes en présence desquels il est placé. Il s'agit là d'un processus de transduction phagique.

### SUMMARY

#### PHAGE TRANSDUCTION OF SPOROGENESIS IN *B. anthracis*.

1. By means of the E specific phage, the author succeeded in inducing sporogenesis in several asporogenous *B. anthracis* strains, particularly in recently isolated strains. He never succeeded in inducing sporogenesis in asporogenous strains isolated and kept in the laboratory for more than one year. Besides, all recently isolated asporogenous strains have not the same comportment : some of them e. g. strain 1891, rapidly react to the phage infection by production of asporogenous germs, others are not influenced by the phage.

2. It seems that the phage, after multiplying in sporogenous germs (and so becoming a carrier of the sporogenesis factor), transfers this factor to the asporogenous germs into which it penetrates. We are here in presence of a phage transduction phenomenon.

### BIBLIOGRAPHIE

- BORDET (J.) et RENAUX (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **45**, 1.  
BROWN (E. R.) et coll. *J. Bact.*, 1955, **69**, 590.  
CIUCA (M.) et coll. *Arch. roum. Path. exp. (sous presse)*.  
IVANOVICS (G.) et FOLDES (J.). *Acta microb. Acad. Sci. Hung.*, 1958, **5**, 89.  
LEDERBERG (J.). *Bact. Rev.*, 1957, **21**, 133.  
PREISZ (H.). *Zbl. Bakt.*, 1904, **35**, 280 et 416.  
STAMATIN (N.). *Arch. vet.*, Bucarest, 1934, **26**, 1, et 1935, **27**, 1.  
STAMATIN (N.) et LI VAN SOB. *Arch. roum. Path. exp. (sous presse)*.  
STERNE (M.) et PROOM (H.). *J. Bact.*, 1957, **74**, 541.
-

## ESSAIS DE TITRAGE DES ANTICORPS NEUTRALISANT LE VIRUS BOVIPESTIQUE

par M. HUARD, J. ANDRÉ et J. FOURNIER

(avec la collaboration technique de LAM-QUANG-CHUONG).

(Institut Pasteur du Viet-Nam)

Nakamura et ses collaborateurs (1954, 1955 *a*, 1955 *b*, 1957 *a*, 1957 *b*) ont proposé différentes techniques pour le titrage dans les sérums des bovidés des anticorps neutralisant le virus de la peste bovine. Cette recherche est d'un grand intérêt pour la standardisation des sérums, pour l'appréciation des résultats de la vaccination, pour le diagnostic de la maladie et pour les enquêtes épizootologiques.

Les techniques de Nakamura sont basées sur le fait que les anticorps acquis à la suite d'une infection par le virus originel (= non lapinisé) neutralisent le virus lapinisé (L ou LA) et protègent le lapin (ou l'œuf embryonné) contre l'infection par celui-ci.

Nakamura et ses collaborateurs mettent en présence l'antigène et l'anticorps à la température de 4° C. Cette température, qui, d'une manière générale, convient mal à une fixation complète et stable, semble avoir été choisie en raison de la thermolabilité toute particulière du virus bovipéste.

Il nous a paru intéressant de procéder à des expériences inspirées par celles des auteurs japonais, mais en mettant en jeu un matériel local (souche bovipéste bovine isolée à Nhatrang, bétail du Centre-Vietnam) et en procédant à la fixation anticorps-antigène à la température de 37°.

A. EPREUVES PRÉALABLES. — Cette dernière condition n'était possible que si l'on pouvait protéger le virus contre les effets nocifs d'une température de 37° maintenue pendant une heure. Après divers essais, notre choix s'est porté, pour cela, sur l'emploi d'un diluant composé de solution de Hanks additionnée de sérum de poulain dans la proportion de 10 p. 100.

### Solution de Hanks :

NaCl .....	8	g
KCl .....	0,4	g
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O .....	0,2	g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,14	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O .....	0,15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,6	g
NaHCO <sub>3</sub> .....	0,35	g
Glucose .....	1	g
Rouge de phénol .....	0,1	g
Eau bidistillée .....	1 000	cm <sup>3</sup>



Le bicarbonate est incorporé au moment de la filtration. Le liquide est réparti en ampoules de 20 ml et conservé (pas plus de trois mois) à la température de  $+4^{\circ}\text{C}$ . Le sérum de poulain est ajouté au moment de la dilution du virus. Ce dernier est fourni par un broyat de ganglion de lapin infecté par la souche lapinisée *Nakamura III* entretenue à l'Institut Pasteur de Nhatrang.

Dans un ensemble d'épreuves préalables portant d'abord sur une série de 8 lapins, nous avons injecté à chaque animal 1 ml d'une suspension de broyat de ganglion infecté diluée dans le liquide de Hanks additionné de sérum de poulain, les dilutions allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-8}$ , et chaque dilution ayant été maintenue une heure à l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ . A différents intervalles de temps nous avons répété cette épreuve sur trois autres séries de 8 lapins en utilisant, bien entendu, des ganglions mésentériques correspondant à des passages différents. Dans deux séries la dilution  $10^{-8}$  fut infectante ; dans une série la dilution maxima infectante fut  $10^{-6}$  et dans une autre  $10^{-5}$ .

Ceci montre que :

a) Aux taux ci-dessus indiqués le virus dilué en Hanks + sérum de poulain et conservé une heure à  $37^{\circ}$  peut être utilisé pour les tests de neutralisation.

b) Au cours des passages sur lapins le pouvoir pathogène du virus *Nakamura III* présente des fluctuations qui rendent indispensable un titrage de ce pouvoir pathogène accompagnant chaque test de neutralisation.

B. TEST DE NEUTRALISATION. — 1° *Matériel*. — Lapins pesant chacun 1,500 kg et ayant été mis en observation pendant cinq jours avec prise biquotidienne de la température.

Sérums de bovins et de bubalins : a) veaux et bufflons non vaccinés ; b) veaux et bufflons vaccinés avec la souche bovine ; c) bœufs hyper-immunisés avec les souches bovine et lapinisée (pour la production de sérum). Tous ces sérums furent chauffés trente minutes à  $56^{\circ}$  avant d'être utilisés dans les expériences.

Suspensions virulentes : broyats en liquide Hanks + sérum de poulain de ganglions mésentériques de lapins ayant servi aux passages réguliers du virus lapinisé *Nakamura III*.

2° *Préparation des dilutions du virus*. — A partir d'une suspension-mère d'un broyat de ganglion mésentérique dans une quantité de diluant quatre fois supérieure en poids, nous préparons, en utilisant toujours le même diluant, une série de dilutions en progression géométrique de raison  $10^{-1}$  allant de  $1/5$  à  $2 \times 10^{-8}$ .

3° *Neutralisation et contrôle de la virulence*. — Nous disposons deux séries de huit tubes à hémolyse ; chaque tube reçoit 1 ml de dilution du virus. Dans chaque série on commence par la dilution  $1/5$  et le huitième tube reçoit la dilution  $2 \times 10^{-8}$ .

Dans chaque tube de la série n° 1 nous ajoutons 1 ml du sérum à titrer et dans chaque tube de la série n° 2, 1 ml du liquide Hanks + sérum de poulain.

Les dilutions finales du virus dans chaque série vont donc de  $1/10$  à  $1 \times 10^{-8}$ .

Les tubes sont maintenus pendant une heure à l'étuve à  $37^{\circ}$ .

Nous répartissons 16 lapins en deux séries de 8. Dans la série n° 1 chaque lapin reçoit par voie intraveineuse 1 ml du mélange virus + sérum, en commençant par la dilution  $10^{-1}$ . Dans la série n° 2 chaque lapin reçoit de la même façon 1 ml du mélange virus + liquide conservateur.

4° *Observation et notation des résultats.* — Les dilutions virulentes provoquent une montée thermique brutale qui, suivant la dilution, se produit de vingt-quatre à quarante-huit heures après l'injection et atteint de 1 à 2° C. Cette hyperthermie se maintient deux jours en moyenne. A cette évolution de la température correspondent des lésions typiques constatées à l'autopsie.

Nous notons dans chaque série la dilution maxima ayant donné la réaction thermique caractéristique (le contrôle nécropsique ne fait donc sacrifier que deux lapins pour chaque test). La différence entre les logarithmes de ces deux dilutions donne le titre de protection. Ainsi par exemple, si dans la série n° 2 la dernière dilution virulente est  $1 \times 10^{-7}$  et si dans la série n° 1 la dernière dilution non neutralisée est  $1 \times 10^{-2}$ , le titre du sérum est  $7 - 2 = 5$ .

C. EXPOSÉ DES RÉSULTATS. — 1° *Animaux non vaccinés.* — a) Sur 33 bêtes provenant des troupeaux de la province de Khanh-Hoa, 2 veaux et 1 bufflon ont fourni des sérums titrant respectivement 5,5 et 4, et se sont montrés réfractaires à l'infection expérimentale par la souche bovine (épreuve sévère consistant en l'injection sous-cutanée de 10 ml d'émulsion à 1/10 de rate virulente) ;

b) Trois bufflons ont fourni des sérums de titre 1 et ont contracté la maladie dans les délais normaux après injection de matériel virulent comme ci-dessus ;

c) Chez aucune des 27 autres bêtes nous n'avons décelé d'anticorps neutralisants et ces bêtes se sont montrées parfaitement réceptives à l'infection expérimentale (utilisées pour les passages du virus bovin en vue de la préparation du vaccin formolé type Jacotot).

2° *Veaux et bufflons vaccinés.* — Aucune bête ne fournit de sérum d'un titre inférieur à 3. Des expériences sont en cours pour comparer par ce moyen des vaccins de types différents. Ces expériences doivent être prolongées au delà d'un an pour apprécier la formation et la persistance des anticorps neutralisants conjointement avec celles de l'immunité vis-à-vis de l'infection expérimentale.

3° *Bœufs hyperimmunisés.* — Il s'agit de bœufs hyperimmunisés à l'Institut Pasteur de Nhatrang en vue de la production du sérum antibovipestique selon un procédé décrit par Fournier et coll. (1958). Ce procédé associe les injections de virus-souche bovine et celles de virus-souche lapinisée Nakamura III. Le titre moyen des sérums fournis par ces bœufs est 5. Or ces sérums, injectés en même temps que le virus d'épreuve (souche bovine), protègent le veau et même le bufflon contre l'infection expérimentale (absence de symptômes chez le premier ; maladie non mortelle chez le second ; les témoins non protégés succombant dans les délais normaux).

CONCLUSIONS. — La recherche des anticorps neutralisants proposée par Nakamura renseigne de façon valable, dans les conditions réunies au Centre-Vietnam, sur la valeur des sérums antibovipestiques et sur

l'immunité consécutive à la vaccination ou à l'infection occulte. Ce dernier point est important pour les enquêtes épizootologiques et pour le choix des animaux utilisés en vue de la production des vaccins et des sérums anti-bovipestiques.

Au cours des épreuves de neutralisation, l'emploi d'un diluant protecteur (liquide de Hanks + sérum de poulain) permet d'opérer à 37° C (et non plus à + 4° C) et de se rapprocher ainsi des conditions optima de formation et de stabilité du complexe antigène-anticorps.

Nous décrivons une technique de titrage qui nous donne satisfaction.

### SUMMARY

#### ATTEMPTS AT TITRATION OF RINDERPEST NEUTRALIZING ANTIBODIES.

Nakamura's technique for the demonstration of neutralizing antibodies is reliable in the general conditions of Centre Vietnam : it yields good results as to the efficiency of anti-rinderpest sera and immunity following vaccination or inapparent infection, this last fact being important with a view to epizootologic enquiries and the selection of animals used for production of anti-rinderpest vaccines and sera.

The use of a protective diluent (Hanks fluid + foal serum) allows neutralization at 37° C (and not at + 4° C like Nakamura and coll.), approaching the optimal conditions of antigen-antibody system formation and stability.

The authors describe their technique, which gives satisfactory results.

### BIBLIOGRAPHIE

- FOURNIER (J.), HUARD (M.) et CHUONG (L. Q.). 1958 (*à paraître*).  
NAKAMURA (J.), MATSUZAWA (H.), KISHI (S.) et KIUCHI (J.). *37th Meet. Jap. Soc., Vet. Sci.*, 1954.  
NAKAMURA (J.), KISHI (S.), KIUCHI (J.) et REISINGER (R.). *Am. J. Vet. Res.*, 1955 a, **16**, 1.  
NAKAMURA (J.) et KISHI (S.). *39th Meet. Jap. Soc. Vet. Sci.*, 1955 b.  
NAKAMURA (J.). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1957 a, **47**, 542.  
NAKAMURA (J.). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 1957 b, **47**, 555.

---

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

**Etude de trois souches microbiennes (famille des *Pseudomonadaceae*) dont la synergie provoque une maladie de caractère septicémique chez les poissons blancs de la Dordogne, du Lot et de leurs affluents**, par J. BRISOU, C. TYSSET et B. VACHER.

**Etude de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche de bacille de Whitmore**, par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG DE ROSNAY et J. SALVAT.

**Préparation d'antitoxine anti-tétanique par immunisation des chevaux avec des anatoxines tétaniques de haute pureté**, par M. RAYNAUD, A. TURPIN, E. H. RELYVELD, R. CORVAZIER et O. GIRARD.

**Fluorescence et acido-alcool-résistance relative du bacille tuberculeux**, par J. DEGOMMIER.

**Contribution à l'étude des conditions de conservation de la viabilité d'une souche de bacille typhique par lyophilisation en vue de la fabrication d'un vaccin radio-inactivé. — I. Etude de la phase de congélation initiale : recherches sur la résistance du bacille typhique à l'exposition aux basses températures**, par P. SERVANT, L. REY et P. BONÉT-MAURY.

---

#### AVIS

Le II<sup>e</sup> Congrès International de Pathologie Infectieuse aura lieu à Milan, du 6 au 10 mai 1959, sous la présidence du professeur Giovannardi.

Pour tous renseignements, s'adresser à M. le professeur Zanuzzi, secrétaire général, Istituto di Igiene dell' Università, Via Francesco Sforza 35, Milan, Italie.

---

#### LIVRES REÇUS

**H. J. Otte et W. Koehler.** — *Die Praxis der Resistenz- und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie*. Gustav Fischer Verlag. Jéna, 1958. Prix : DM 18,60.

Les auteurs résument les données intéressant la découverte, la chimie, la production et le spectre d'activité des principaux antibiotiques. Pour chacun, ils détaillent quelques techniques de dosage ou de détermination de la sensibilité des germes, dont quelques-unes assez anciennes. Ce livre peut être utile comme première information sur ce sujet.

Y. C.

**H. P. R. Seeliger.** — *Listeriose*. Johann Ambrosius Barth, édit., Leipzig, 1958, 194 p. Prix : DM 23,20.

La seconde édition de la monographie de H. P. R. Seeliger, professeur à l'Université de Bonn, sur la listeriose, représente une édition revue et complétée par plus de 150 nouvelles publications sur la question, parues depuis la première édition en 1955. Ce fait à lui seul souligne l'intérêt que, ces dernières années, ont suscité les infections à *Listeria*, aussi bien dans la pathologie animale que dans la pathologie humaine.



L'auteur, que l'on connaissait jusqu'ici, d'après ses travaux sur les salmonelles et les salmonelloses, par ses propres recherches et par l'exposé et la critique pertinents des différentes questions liées aux infections à *Listeria*, rend la présente monographie indispensable aussi bien aux médecins et vétérinaires, qu'aux chercheurs de laboratoire.

La première partie est consacrée au germe de la listériose, *Listeria monocytogenes*, à sa biologie et à sa sérologie, ainsi qu'à la classification en types sérologiques d'après les antigènes O et H du germe, à sa lysotypie, sa toxicité et son pouvoir pathogène.

La seconde partie traite de la listériose animale et la troisième de la listériose humaine.

Plusieurs tableaux accompagnent ces deux parties, spécialement sur l'épidémiologie et la thérapeutique par les antibiotiques. Un développement important est donné aux formes cliniques et à l'anatomopathologie, cette dernière illustrée par plusieurs photographies des lésions macro- et microscopiques.

Enfin, le dernier chapitre est consacré au diagnostic sérologique et bactériologique de la maladie.

La très riche bibliographie, 537 publications parues dans le monde entier, rend cette monographie de 194 pages très précieuse pour tous ceux qui veulent se documenter sur la question des *Listeria* et de la listériose.

J. G.

**R. Prigge.** — *Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, dem Georg-Speyer-Haus und dem Ferdinand-Blum-Institut zu Frankfurt a. M.* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1958, 130 pages.

Le bilan détaillé sur l'activité des trois grands Instituts de Francfort-sur-le-Main, pendant les cinq dernières années, c'est-à-dire depuis leur réinstallation à Francfort, est donné dans un fascicule de 130 pages.

L'Institut Paul Ehrlich s'occupe des questions de thérapeutique expérimentale, vaccins, sérums, sérologie et biologie médicale et vétérinaire. Une grande partie de ses recherches est consacrée à la standardisation de ces produits.

Les travaux de l'Institut Georg Speyer concernent la chimiothérapie dans ses différentes branches et l'application des cultures de tissu aux recherches biologiques.

Enfin, l'Institut Ferdinand Blum s'occupe de recherches sur la pharmacologie et la virologie.

La présentation par de courts résumés de l'activité scientifique et pratique est très utile et démonstrative. Ce fascicule se termine par la bibliographie des travaux publics et la liste du personnel scientifique de ces instituts.

J. G.

**Jacobs, Gerstein et Walter.** — *Dictionary of microbiology.* Van Nostrand, édit. Princeton (New-Jersey). Prix : \$ 6,75.

Ce dictionnaire de 276 pages donne pour les groupes et espèces bactériennes les produits et réactions chimiques couramment utilisés en bactériologie, une définition sommaire. Tout spécialiste trouvera un



peu simplistes les définitions relatives à sa spécialité. Cependant ce dictionnaire présente un intérêt pour y rechercher le mode de préparation d'un réactif ou les caractères essentiels de bactéries, champignons ou virus, avec lesquels il n'est pas familiarisé.

L. L.

R. Y. Stanier, M. Doudoroff et E. A. Adelberg. — *General microbiology*. Macmillan et Co, édit., Londres, 1958. 682 pages. Prix : 50 shillings.

Ce livre, destiné aux étudiants de sciences biologiques, leur présente de façon très didactique nos connaissances actuelles dans le domaine microbiologique. Il est divisé en trois parties : la première traite des propriétés des microorganismes. Après une introduction historique et une description sommaire des méthodes microbiologiques et de la position des microorganismes dans le monde vivant, les principaux groupes de microorganismes sont étudiés. Puis viennent une série de chapitres sur l'anatomie et la physiologie bactérienne, les sources d'énergie, la croissance bactérienne, l'action des substances chimiques et des facteurs physiques sur la croissance et la mort, l'application de ces données physiologiques à la nutrition et la culture des bactéries. Les caractères des principaux groupes bactériens sont étudiés sur ces bases. Ce chapitre se termine par une étude sur les virus, les mutations et le transfert génique, la sélection, l'adaptation et l'évolution des bactéries. Dans la deuxième partie, « Ecologie des microorganismes », sont discutés les divers rôles des bactéries comme agents des changements géochimiques, de maladies et de procédés industriels. Elle comprend un chapitre sur la dynamique des maladies dans les populations. La troisième partie, « Bases biologiques », est une revue des principes de biologie cellulaire utiles à la compréhension des deux parties précédentes : composition, structure et reproduction des organismes vivants, génétique, évolution et classification, biochimie et nutrition.

Ce livre ne contient pas de bibliographie des travaux cités. Seuls sont indiqués avec une ligne de commentaire, un certain nombre d'ouvrages dont la lecture est conseillée. La personnalité des auteurs suffit à garantir la qualité de cette *Microbiologie générale*, que tous les bactériologistes liront avec le plus grand intérêt. La présentation en est excellente.

L. L.